Scanned with OKEN Scanner

DAN D. BEDELEANU

IOAN MANTA

BIOCHIMIE MEDICALĂ & FARMACEUTICĂ

Vol. I

BIOCHIMIE STRUCTURALĂ

(Glucide • Lipide • Proteine • Vitamine)

Scanned with OKEN Scanner

577.1
B40

DAN D. BEDELEANU IOAN MANTA

BIOCHIMIE MEDICALĂ & FARMACEUTICĂ

vol. I

BIOCHIMIE STRUCTURALĂ

GLUCIDE • LIPIDE • PROTEINE • VITAMINE

Scanned with OKEN Scanner

Personalitate copleşitoare, prin cultura profundă, parte intrinsecă a fiinţei sale, însuşită încă de la început ca bursier al Liceului Internat „C. Negruzzi" din Iaşi şi desăvîrşită prin obţinerea titlurilor de licenţiat în chimie (Iaşi), licenţiat în farmacie (Cluj), doctor în chimie (Nancy), profesorul I. Manta *(1900—1979) face parte din pleiada de iluştri dascăli ai Şcolii Medicale Clujene, din perioada sa de apogeu, învestit cu titlu de profesor încă din anul 1937.*

Numele profesorului Manta *rămîne nepieritor înscris între ale marilor personalităţi ştiinţifice din ţara noastră, atît prin contribuţiile ştiinţifice aduse prin cele aproximativ 200 de lucrări, deschizătoare de noi orizonturi în biochimia medicală, experimentală şi în elucidarea funcţiilor particulelor subcelulare în condiţii normale şi patologice (ateromatoză, diabet, boli hepatice, renale, neurologice, endocrine; teste noi de laborator clinic etc.), prin elaborarea şi introducerea în terapie a unor noi medicamente (15 inovaţii), cît şi prin cele 15 cărţi de specialitate, dintre care* „Manualul de Biochimie medicală" *(1945) şi* „Metodele laboratorului clinic" *(în colab. cu Al. Ciplea,* 1944 *şi ed. II,* 1947*) se înscriu ca* primele lucrări *din aceste domenii tipărite la noi în ţară.*

Prezentul volum, *care cuprinde aspectele* structurale *(formule, proprietăţi fizico-chimice şi biologice) ale glucidelor, lipidelor, proteinelor şi vitaminelor, se doreşte un pios omagiu de recunoştinţă adus* PROFESORULUI, *creator de Şcoală şi reprezentant ilustru al Biochimiei românеşti, mereu viu în memoria şi conştiinţa celor ce ne-am împărtăşit din lumina ştiinţei sale, oferită cu inegalabilă generozitate şi competenţă.*

Scanned with OKEN Scanner

Volumele II şi III, în pregătire *vor fi consacrate* „Biochimiei dinamice" *(enzime, metabolisme intermediare)* şi *respectiv* „Biochimiei funcţionale" *(biochimia organelor, ţesuturilor, glandelor endocrine, sîngelui, excreţiilor etc.).*

Distinse mulţumiri EDITURII DACIA pentru înţelegerea şi bunăvoinţa arătată în editarea lucrării.

Prof. dr. D. BEDELEANU
(I.M.F. Cluj-Napoca)

Scanned with OKEN Scanner

PRESCURTĂRI

A = adenina
AA = AMP (ac. adenilic)
aa = aminoacizi
ACP = acyl-carrier-protein
ACTH = adrenocorticotrop hormon
ADH = alcooldehidrogenază
ADN = ac. desoxiribonucleic
Ala = alanina
ALA = ac. δ-aminolevulinic
AMP = ac. adenozinmonofosforic
ADP = ac. adenozindifosforic
ATP = acid adenozintrifosforic
cAMP = AMP ciclic
Arg = arginina
ARN = acid ribonucleic
s = solubil = t = transfer m = mesager = i= = informație r = ribozomal
Asn = asparagina
Asp = aspartat
—aza = sufix pentru enzime
BAL = British anti-lewysite = 2, 3-mercaptopropanol
C = citozină
CC = TCA = ciclul citric
CBG = corticosteroid binding globulin
CBP = idem-protein
Cis = cisteină
Cit = citocromi
CMP, CDP, CTP = citozin-mono, di- sau trifosfat
C.Z. = clasificare zecimală (la enzime)
d = densitate
d— = 2′-deoxiribo-
D = dalton = $1{,}66 \times 10^{-24}$ g
—DC = —decarboxilază
—DH = —dehidrogenază
DIPPF = diizopropilfosfofluoridat
DIT = diiodotirozină
DNA = ADN
DRN = ARN
DNP = 2, 4-dinitrofenol
e^- = electron
E = enzimă
EPR = rezonanță paramagnetică electronică
FAD, $FADH_2$ = flavinadenindinucleotid (ox., redus)
FDNP = flor-DNP
f = formil-
FMN, $FMNH_2$ = flavinadeninmono-(P)
F.R. = Farmacopeea Română
F.R. IX = idem, ediția IX
G = guanină
Gli = glicocol (glicină)
Gln = glutamină
Glu = ac. glutamic
GMP, GDP, GTP = guanozin-mono,-di- sau trifosfat
GOT, GPT = glutamic-oxalacetic sau piruvic transaminaze
gr. = greutate
gr. corp. = greutate corporală
gr. mol. = greutate moleculară
G-SH, G-S-S-G- = glutation (red., oxid.)
G-1-P-, G-6-P = glucozo-fosfați
Hb, Hb-O_2 = hemoglobină, oxihemoglob.
His = histidina
Hip, Hipro = hidroxiprolina
IgG, IgM = imunoglobuline G, sau M
I, IMP, IDP., ITP = inozină, inozin-mono, di- sau trifosfat
i.m.; i.p.; i.v.; s.c. = injecții: intramusculare; intraperitoneale; intravenoase; subcutane
KG = cetoglutarat
17-KS = 17-cetosteroizi
Leu = leucină
Lis = lizină
LH = hormon luteinizant
LTH = hormon luteotrop, prolactina
Mb, Mb-O_2: mioglobina, oxi-mioglobina
Met = metionina
Met-Hb = methemoglobina
NAD^+, NADH=nicotinamido-adenin-di-nucleotid (oxidat, redus)

Scanned with OKEN Scanner

NADP+, NADPH = nicotinamido-adenin-dinucleotid-fosforilat
OFMM = oxidaze cu funcţiuni mixte microzomiale
(P) = fosfat, P = fosfat anorganic
PP = pirofosfat
Pro = prolina
PRPP = fosforibozilpirofosfat
RE, REN (= RES), RER = reticul endoplasmic neted, rugos
R.M.N. = rezonanţă magnetică nucleară
RNA = ARN
RF = releasing factors (hipotalamus)
T = timina
TMP, TDP, TTP: timidinfosfaţi
TPP (TDP) = tiamin-difosfat
TA, HTA = tensiune arterială, HiperTA
Tir = tirozină
Val = valina
Thr, Tre = treonina
TBA, TBG, TBP = tiroxin-binding-albumina, globulină, proteină
TCA = CC = ciclul citric
Tris = (hidroximetil) amino-metan
T_2, T_3, T_4 = di-, tri-, sau tetra-iod-tironine
TSH = tiroidstimulator-hormon
U = uracil
UMP, UDP, UTP = uridin-mono, di- sau trifosfat
UDP-G = uridindifosfat-glucoza
UDP-GA = uridindifosfat-glucuronat
UDP-Gal = uridindifosfat-galactoza
U.I. = unitate internaţională
X = xantina
XMP, XDP, XTP = xantin-nucleotidele mono, di, trifosforilate
X.O. = xantinoxidaza

Scanned with OKEN Scanner

CUPRINS

Capitolul I

1. CONSTITUENȚII FUNDAMENTALI AI ORGANISMULUI. BIOMOLECULE

1.1. GLUCIDELE (HIDRAȚII DE CARBON) 22
1.1.1. **Nomenclatură. Clasificare** 22
1.1.2. **Izomeria și formulele ozelor** 22
1.1.2.1. *Argumente pentru diferitele formulări ale ozelor* 27
1.1.2.2. *Somboluri în nomenclatură* 30
1.1.3. **Proprietăți fizice și chimice ale ozelor de interes biologic, farmaceutic și în laboratorul clinic** 30
1.1.4. **Glucide (hidrați de carbon) și derivații lor, substrate ale reacțiilor biochimice și de interes farmaceutic** 40
1.1.4.1. Oze (monozaharide) 40
1.1.4.2. Oligoholozide (oligozaharide) 44
1.1.4.3. Oze și ozide aminate 48
1.1.4.4. Esterii fosforici ai ozelor 49
1.1.4.5. Poliozide (polizaharide) 51
1.1.4.6. Mucopolizaharide (glicosamino-glucuronil-glicani) 58
1.1.4.7. Heterozide (glicozide) 62
1.2. LIPIDELE 63
1.2.1. **Criterii de definire a lipidelor** 63
1.2.2. **Acizii grași** 64
1.2.3. **Lipidele simple** 70
1.2.3.1. *Gliceridele* 70
1.2.3.1.1. Proprietăți de interes biochimic și în analizele de laborator . . . 71
1.2.3.1.2. Gliceride de interes farmaceutic 76
1.2.3.2. *Ceride* 78
1.2.4. **Lipide complexe** 81
1.2.4.1. *Fosfogliceride* (glicerofosfatide, fosfatide) 81
1.2.4.2. *Sfingolipide* 85
1.2.4.3. *Inozitolfosfatide* 88
1.2.5. **Steroli, steroizi, steride** 89
1.2.5.1. *Descrierea unor grupe de steroli și derivați* 93
1.2.5.1.1. Colesterolul 93
1.2.5.1.2. Sterolii vegetali 94
1.2.5.1.3. Steridele 94
1.2.5.1.4. Acizii biliari 94
1.2.5.1.5. Derivați steridici 96
1.2.6. **Reacții ale lipidelor și acizilor grași de interes biochimic** 98
1.3. PROTEINELE (PROTIDELE) 102
1.3.1. **Aminoacizii** 102

Scanned with OKEN Scanner

1.3.1.1. *Nomenclatură și simboluri* 102
1.3.1.2. *Proprietățile aminoacizilor* 105
1.3.1.3. *Aminoacizi utilizați în terapie* 113
1.3.1.4. *Aminoacizi naturali neproteici* 114
1.3.2. Peptidele 115
1.3.2.1. *Definiție și nomenclatură* 115
1.3.2.2. *Peptide naturale* 117
1.3.2.2.1. Dipeptide 117
1.3.2.2.2. Tripeptide 117
1.3.2.2.3. Peptide de origine animală și bacteriană. Peptide biologic active. Antibiotice 118
1.3.2.2.4. Reprezentanți mai importanți ai polipeptidelor antibiotice . . 119
1.3.2.2.5. Polipeptide aberante 125
1.3.3. Obținerea și caracterizarea peptidelor și proteinelor. Metodologia de studiu 125
1.3.3.1. *Obținerea și purificarea proteinelor* 125
1.3.3.2. *Compoziția în aminoacizi și dozarea proteinelor* 127
1.3.3.3. *Proteinele ca electroliți și tampoane* 133
1.3.3.4. *Proprietățile de solubilitate ale proteinelor* 137
1.3.3.5. *Comportarea proteinelor în cîmpul electric. Electroforeza* 140
1.3.3.6. *Caracterul coloidal al soluțiilor proteice* 141
1.3.3.6.1. Determinarea greutății moleculare a proteinelor 142
1.3.3.6.2. Echilibrul de membrană Donnan 144
1.3.3.6.3. Proprietățile imunologice ale proteinelor 146
1.3.4. Structura proteinelor 146
1.3.4.1. *Structura primară. Legătura peptidică* 147
1.3.4.1.1. Convenții de reprezentare și nomenclatură 151
1.3.4.1.2. Determinarea structurii primare a proteinelor 152
1.3.4.1.3. Sinteza peptidelor 156
1.3.4.2. *Structura secundară a proteinelor. Structuri periodice: α-helix, foaie pliantă β și helix de colagen* 158
1.3.4.2.1. Metodele de studiu ale structurilor secundare 160
1.3.4.3. *Structura terțiară și cuaternară a proteinelor* 161
1.3.4.4. *Tipuri de forțe și legături din moleculele proteice* 163
1.3.4.4.1. Importanța spectrelor Raman în studiul proteinelor 166
1.3.4.5. *Denaturarea proteinelor* 168
1.3.5. Proteine de interes biologic și farmaceutic 172
1.3.5.1. *Holoproteine* 173
1.3.5.1.1. Holoproteine solubile (globulare) 173
1.3.5.1.2. Holoproteine insolubile (scleroproteinele) 176
1.3.5.2. *Heteroproteide. Proteine conjugate* 178
1.3.5.2.1. Glicoproteide 178
1.3.5.2.2. Fosfoproteidele 183
1.3.5.2.3. Lipoproteide 184
1.3.5.2.4. Carotenoproteide 184
1.3.6. Nucleoproteide. Acizii nucleici. Baze pirimidinice și purinice. Nucleozide. Nucleotide 185
1.3.6.1. *Baze pirimidinice și purinice* 186
1.3.6.1.1. Bazele pirimidinice 187
1.3.6.1.2. Bazele purinice 187
1.3.6.2. *Nucleozide* 190
1.3.6.3. *Nucleotidele* 190

Scanned with OKEN Scanner

1.3.6.4. *Nucleozid(poli)fosfaţii* 193
1.3.6.5. *Acizii desoxiribonucleici. ADN. DNA. DRNA* 193
1.3.6.5.1. Izolarea ADN 194
1.3.6.5.2. Determinarea greutăţii moleculare a ADN 194
1.3.6.5.3. Compoziţia în baze (nucleotide) a ADN 196
1.3.6.5.4. Structura primară a ADN 198
1.3.6.5.4.1. Determinarea structurii primare a ADN 199
1.3.6.5.5. Structura spaţială: modelul ADN dublu-helix 200
1.3.6.5.6. Conformaţia ADN 204
1.3.6.5.6.1. Metode pentru stabilirea conformaţiei ADN 204
1.3.6.5.7. Forţele implicate în conformaţia ADN 206
1.3.6.5.7.1. Denaturarea şi reasocierea (renaturarea) ADN . . . 206
1.3.6.5.8. Tipuri de ADN. Subunităţi de ADN 208
1.3.6.6. *Acizii ribonucleici. ARN. RNA* 210
1.3.6.6.1. Tipuri de acizi ribonucleici 211
1.3.6.6.1.1. ARN solubil (s-ARN) sau de transport (t-ARN) . . . 211
1.3.6.6.1.2. ARN ribozomal (r-ARN) şi viral 215
1.3.6.6.1.3. ARN mesager (*m*-ARN) sau de informaţie (*i*-ARN) 217
1.3.6.7. *Nucleoproteidele* 218
1.3.6.7.1. Reacţii de identificare a nucleoproteidelor 219
1.3.7. Metaloproteide 219
1.3.7.1. *Exemple de metaloproteide* 220
1.3.7.1.1. Proteine cu fier 220
1.3.7.1.2. Proteine cu cupru 220
1.3.7.1.3. Proteine cu zinc 220
1.3.7.1.4. Proteine cu alte metale 220
1.3.8. Hemoproteide 221
1.3.8.1. *Porfirinele* 221
1.3.8.2. *Hemi. Hemine* 223
1.3.8.3. *Mioglobine* (*Mb*). *Hemoglobine* (*Hb*) 224
1.3.8.3.1. Metode de studiu 224
1.3.8.3.2. Structura primară a globinelor din Mb şi Hb 226
1.3.8.3.2.1. Tipuri de hemoglobine umane 227
1.3.8.3.3. Structura tridimensională a mioglobinei (Mb) 230
1.3.8.3.4. Structura tridimensională a hemoglobinei (Hb) 235
1.3.8.3.4.1. Procese de asociere-disociere ale Hb 237
1.3.8.3.5. Relaţii structură-funcţie. Echilibrul cu diferiţi liganzi 238
1.3.8.3.6. Oxihemoglobina (HbO_2). Coeficientul lui Hill 238
1.3.8.3.6.1. Modificări conformaţionale în sistemul Hb—HbO_2 . . 243
1.3.8.3.6.2. Influenţa pH-ului. Efectul Bohr 249
1.3.8.3.6.3. Efectul CO_2. Carboxiaminohemoglobina (Hb—CO_2) . 251
1.3.8.3.6.4. Efectul difosfogliceratului (DPG) 252
1.3.8.3.6.5. Interacţiuni cu anticorpii şi haptoglobina 255
1.3.8.3.7. Efectul CO. Carboxihemoglobina (HbCO) 255
1.3.8.3.7.1. Fumatul şi oxidul de carbon 256
1.3.8.3.8. Methemoglobina (Met—Hb, MetHb) 258
1.3.8.3.8.1. Medicamente methemoglobinizante 259
1.3.8.3.9. Sulfhemoglobina (Sulf—Hb) 262
1.3.8.3.10. Consideraţii genetice asupra hemoglobinelor 262
1.3.8.3.10.1. Hemoglobine anormale 265

Scanned with OKEN Scanner

1.3.8.4. *Citocromii* 267
1.3.8.4.1. Complexul „citocrom a/a_3" sau „citocromoxidaza" 270
1.3.8.4.2. Citocromii b 271
1.3.8.4.3. Citocromii c 272
1.3.8.5. *Hidroperoxidaze: Peroxidaze. Catalaze* 275
1.3.8.6. *Leghemoglobina: Cromoproteida vegetală* 278
1.3.9. **Heteroproteide cu magneziu, pigmenţii clorofilieni** 278
1.3.9.1. *Structura şi proprietăţile clorofilei şi derivaţilor* 279

Capitolul II

2. BIOCATALIZATORI

2.1. VITAMINELE 285
2.1.1. **Consideraţii generale** 285
2.1.1.1. *Definiţie* 285
2.1.1.2. *Istoric* 285
2.1.1.3. *Definirea stărilor patologice determinate de carenţa sau excesul vitaminelor* 287
2.1.1.3.1. Vitaminele ca „factori esenţiali" 288
2.1.1.4. *Rolul vitaminelor în sistemele biochimice* 289
2.1.1.5. *Principiile de dozare ale vitaminelor* 291
2.1.1.6. *Nomenclatura şi definirea unor termeni* 292
2.1.1.7. *Clasificarea vitaminelor* 294
2.1.1. **Vitamine liposolubile** 294
2.1.2. **Retinolii. Provitaminele şi vitaminele A** 294
2.1.2.1. *Carotenii: Provitamine A* 295
2.1.2.1.1. Condiţii de provitamină. Transformarea în vitamina A 297
2.1.2.2. *Retinolii. Vitaminele A. Vitamina antixeroftalmică. Axeroftolii* 297
2.1.2.2.1. Metabolismul provitaminelor şi vitaminelor A 301
2.1.2.2.2. Rolul metabolic şi interacţiunile vitaminei A 306
2.1.2.2.3. Necesarul de vitamină A. Cauzele hipovitaminozei A. Antivitaminele A 309
2.1.2.2.4. Acţiunile vitaminei A. Manifestările hipo- şi avitaminozelor A 310
2.1.2.2.5. Participarea vitaminei A în procesul vederii. Acţiunea retinotropă. Mecanismele biochimice (moleculare) ale excitaţiei vizuale 313
2.1.2.2.6. Hipervitaminoza A 319
2.1.2.2.7. Indicaţii terapeutice 320
2.1.3. **Calciferolii. Provitaminele şi vitaminele D. Vitamina antirahitică** 321
2.1.3.1. *Provitaminele D* 321
2.1.3.1.1. Transformarea fotochimică şi obţinerea provitaminelor D . . . 321
2.1.3.1.2. Activări nonfotochimice 325
2.1.3.2. *Calciferolii. Vitaminele D. Vitaminele antirahitice* 326
2.1.3.2.1. Proprietăţi fizico-chimice şi metode de dozare 326
2.1.3.2.2. Metabolismul provitaminelor şi vitaminelor D. Activări „primare" 327
2.1.3.2.3. Activarea „secundară". Sistemul vitaminelor D 328
2.1.3.3. *Rolul „sistemului vitaminelor D" în procesele metabolice şi în funcţiile ţesuturilor şi organelor* 330
2.1.3.3.1. Rolul în metabolismul calciului şi a fosfaţilor 330
2.1.3.3.2. Importanţa vitaminelor D pentru ţesuturi şi organe 335

Scanned with OKEN Scanner

2.1.3.4. *Hipo- şi avitaminoza D. Rahitismul* 336
2.1.3.4.1. Necesităţi. Cauzele hipovitaminozelor. Interacţiuni. Antivitamine 337
2.1.3.4.2. Manifestările hipo- şi avitaminozei (rahitismului) umane . . . 338
2.1.3.5. *Hipervitaminoza D. Toxicitatea vitaminelor D* 340
2.1.3.6. *Profilaxia şi terapia rahitismului* 341
2.1.4. Tocoferolii. Vitamina E. Vitamina antisterilică 342
2.1.4.1. *Structura şi prepararea tocoferolilor* 342
2.1.4.2. *Proprietăţi. Unităţi. Metode de dozare* 344
2.1.4.3. *Oxidoreducerile şi metabolismul tocoferolilor* 345
2.1.4.4. *Rolul şi efectele biochimice ale tocoferolilor. Interrelaţii cu alte vitamine* . . . 348
2.1.4.5. *Hipo- şi avitaminoza E* 352
2.1.4.5.1. Carenţa vitaminei E la animale 353
2.1.4.5.2. Necesităţile şi carenţa vitaminei E la om 353
2.1.4.6. *Indicaţii terapeutice. Hipervitaminoza E* 355
2.1.5. Acizii graşi esenţiali (AGE). Vitamina F 355
2.1.5.1. *Rolul biochimic al AGE* 355
2.1.5.2. *Carenţa AGE. Necesităţi. Indicaţii.* 356
2.1.6. Filochinonele. Vitaminele K. Vitaminele antihemoragice 357
2.1.6.1. *Vitaminele K naturale* 357
2.1.6.2. *Vitaminele K de sinteză* 359
2.1.6.3. *Relaţii „structură-activitate". Antivitamine K* 363
2.1.6.4. *Metode de determinare. Unităţi* 364
2.1.6.5. *Metabolismul vitaminelor K* 365
2.1.6.6. *Rolul biochimic al vitaminelor K* 366
2.1.6.7. *Avitaminoza K. Necesităţi* 368
2.1.6.8. *Indicaţii. Toxicitate* 369
2.1.II. VITAMINELE HIDROSOLUBILE 370
2.1.II.1. Vitaminele din grupul B 370
2.1.7. Tiamina, vitamina B_1. Vitamina anti beri-beri. Vitamina antineuritică. Aneurina . . 371
2.1.7.1. *Structura vitaminei B_1. Preparare* 371
2.1.7.2. *Relaţii, „structură-activitate". Antivitaminele B_1* 372
2.1.7.3. *Proprietăţi. Teste. Unităţi.* 373
2.1.7.4. *Metabolismul vitaminei B_1* 376
2.1.7.5. *Rol biochimic. Interrelaţii* 377
2.1.7.6. *Hipo- şi avitaminoza B_1. Necesităţi. Hipervitaminoza* 378
2.1.7.7. *Indicaţii terapeutice* 380
2.1.8. Riboflavina. Vitamina B_2. Lactoflavina 380
2.1.8.1. *Structura riboflavinei. Preparare* 381
2.1.8.2. *Relaţii „structură-activitate". Antivitaminele B_2* 383
2.1.8.3. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare. Unităţi* 384
2.1.8.4. *Metabolismul vitaminei B_2* 387
2.1.8.5. *Rol biochimic. Interrelaţii vitaminice* 388
2.1.8.6. *Hipo- şi avitaminoza B_2. Necesităţi* 391
2.1.8.7. *Indicaţii terapeutice. Hipervitaminoza* 392
2.1.9. Piridoxina. Vitamina B_6. Adermina. Vitamina antipelagroasă a şobolanului 393
2.1.9.1. *Structura. Preparare.* 393
2.1.9.2. *Relaţii „structură-activitate". Antivitamine* 394
2.1.9.3. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare. Unităţi* 396
2.1.9.4. *Metabolismul vitaminelor B_6* 397
2.1.9.5. *Rol biochimic. Interrelaţii vitaminice* 399

Scanned with OKEN Scanner

2.1.9.6. *Avitaminoza B_6. Necesităţi* 401
2.1.9.7. *Indicaţii terapeutice* 403
2.1.10. Acidul nicotinic. Nicotinamida. Vitamina antipelagroasă. Vitamina P.P. Niacina. Niacinamida 404
2.1.10.1. *Structură. Preparare* 404
2.1.10.2. *Relaţii „structură-activitate". Antivitamine* 405
2.1.10.3. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare* 408
2.1.10.4. *Metabolismul vitaminei P.P. Necesităţi* 410
2.1.10.5. *Rol biochimic. Interrelaţii vitaminice* 413
2.1.10.6. *Avitaminoza P.P. Pelagra* 415
2.1.10.7. *Indicaţii terapeutice. Hipervitaminoza* 417
2.1.11. Acidul pantotenic. Vitamina B_3. Vitamina B_Y. Factorul (Filtrant) hepatic. Factorul antidermatitic (antipelagros) al puiului de găină 418
2.1.11.1. *Structura. Relaţii „structură-activitate". Antivitamine* 418
2.1.11.2. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare. Unităţi* 420
2.1.11.3. *Metabolism. Rol biochimic. Relaţii intervitaminice* 420
2.1.11.4. *Carenţa pantotenică. Necesităţi* 422
2.1.11.5. *Indicaţii terapeutice* 423
2.1.12. Biotina. Vitamina H. Bios II (B). Factor X. Biocitina. Coenzima R. 424
2.1.12.1. *Structura. Relaţii „structură-activitate". Antivitamine* 424
2.1.12.2. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare. Unităţi* 426
2.1.12.3. *Metabolismul biotinei* 426
2.1.12.4. *Rol biochimic. Interacţiuni* 427
2.1.12.5. *Avitaminoze. Necesităţi* 428
2.1.12.6. *Indicaţii terapeutice. Hipervitaminoza* 429
2.1.13. Mezoinozitolul. Mioinozitol. Factor bios I 429
2.1.13.1. *Structura. Proprietăţi. Dozări. Antivitamine* 429
2.1.13.2. *Metabolism* 430
2.1.13.3. *Rol biochimic. Carenţă* 432
2.1.13.4. *Indicaţii terapeutice* 433
2.1.14. Acidul para-aminobenzoic. PAB. PABA. Factor B_Y. Vitamina H sau H_2. Gerovital H_3. Aslavital 433
2.1.14.1. *Structura. Relaţii „structură-activitate". Antivitamine* 433
2.1.14.2. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare* 433
2.1.14.3. *Metabolism. Rol biochimic. Carenţă* 434
2.1.14.4. *Indicaţii terapeutice. Toxicitate. Gerovital H_3. Aslavital* 434

Vitamine antianemice

2.1.15. Acizii folici şi folinici. Folacina. Vitamina B_c, M, U sau R. FACTOR „SLR" sau „CF". Norit-eluat-factor. Coenzima C 435
2.1.15.1. *Structura şi caracterizarea grupului folic şi folinic* 435
2.1.15.2. *Relaţii „structură-activitate". Analogi activi şi antivitamine (PAB şi folice)* 440
2.1.15.3. *Metode de dozare. Teste* 443
2.1.15.4. *Metabolism. Rol biochimic. Interrelaţii* 443
2.1.15.5. *Avitaminoza. Necesităţi* 446
2.1.15.6. *Indicaţii terapeutice* 447
2.1.16. Corinoidele. Vitaminele B_{12}. Cianocobalamide. Factor antipernicios. Factor antianemic extrinsec. Factorul proteinelor la animale. Factorul intrinsec castle (F.I.C.) . . . 448
2.1.16.1. *Structură. Nomenclatură. Relaţii „structură-activitate". Analogi. Antivitamine* 448

Scanned with OKEN Scanner

2.1.16.2. *Preparare. Proprietăţi. Metode de dozare* 453
2.1.16.3. *Metabolism* 455
2.1.16.4. *Rol biochimic* 457
2.1.16.5. *Interrelaţii vitaminice* 458
2.1.16.6. *Factorul intrinsec „Castle"* 460
2.1.16.7. *Avitaminoza B_{12}. Necesităţi* 461
2.1.16.8. *Indicaţii terapeutice. Hipervitaminoza* 462
2.1.II.2. Grupul vitaminelor C 463
2.1.17. Acidul ascorbic. Vitamina C. Vitamina antiscorbutică. Acidul hexuronic 463
2.1.17.1. *Structură. Preparare. Relaţii „structură-activitate". Analogi activi şi inactivi (antivitamine)* 463
2.1.17.2. *Proprietăţi fizico-chimice.* 465
2.1.17.3. *Metode de identificare, dozare, teste* 468
2.1.17.4. *Metabolismul vitaminei C* 470
2.1.17.5. *Rol biochimic. Interrelaţii metabolice* 474
2.1.17.6. *Hipo- şi avitaminoza C. Necesităţi* 481
2.1.17.6.1. Necesităţi în vitamina C 481
2.1.17.6.2. Carenţa vitaminei C la animale 483
2.1.17.6.3. Hipo- şi avitaminozele C umane 483
2.1.17.7. *Forme farmaceutice. Indicaţii. Hipervitaminoza C* 485
2.1.18. Flavonoidele. Bioflavonoide. Vitamina C_2. Factorul permeabilităţii. Vitamina P. Citrina 486
2.1.18.1. *Structură. Relaţii „structură-activitate"* 486
2.1.18.2. *Proprietăţi fizico-chimice. Metode de dozare* 487
2.1.18.3. *Metabolism. Rol biochimic* 487
2.1.18.4. *Avitaminoza P* 488
2.1.18.5. *Forme farmaceutice. Indicaţii* 489
2.1.19. Vitamine mai puţin cunoscute sau contestate 489
2.1.20. Interrelaţii vitaminice. Preparate polivitaminice 491
2.1.21. Reconsiderarea vitaminelor. Impactul vitaminelor cu organismul 491
BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ (cărţi de referinţă, manuale, monografii, tratate, ... 493

Capitolul I

1. CONSTITUENȚII FUNDAMENTALI AI ORGANISMULUI. BIOMOLECULE

Analiza chimică elementară arată că organismele animale, inclusiv cel uman, se formează din elementele care se găsesc răspîndite în scoarța pămîntului și respectiv în apă și aer.

Preluarea acestora în circuitul biologic este selectivă, unele dintre ele *C, H, N, S, P* concentrîndu-se (chiar de 200 de ori) în corpul omului. Acestea, împreună cu *O* reprezintă peste 97% din organism și sînt denumite BIOELEMENTE; adăugarea a încă 5 elemente: Ca, K, Na, Cl, Mg arată că 11 elemente constituie peste 99,9% din organismul uman *(Tabelul 1)*

TABELUL 1

Compoziția în elemente a scoarței pămîntului și a corpului uman exprimată în %, număr de atomi (%) și în % din greutatea uscată (modificat după **S. M. Rapoport** (1969); **A. L. Lehninger** (1972); **H. Reinbothe** (1975), **H. J. Jakubke, H. Jesschkeit** (1976)).

ELEMENT	Compoziția la %		*Concentrare la om*	În nr. atomi (%)		*Din greut. uscată* (%)
	Scoarța pămînt.	Om		Scoarța pămînt.	Om	Om
O	50	63		62,5	25,3	20
C	0,09	20	200×	0,08	10,5	50
H	0,9	10	10×		60,3	10
N	0,03	3	100×	0,0001	2,42	8,5
Ca	3,6	1,5		1,94	0,226	4,0
P	0,08	1,0	10×	1,42	0,134	2,5
K	2,6	0,25			0,036	1,0
Na		0,3		2,64	0,73	0,4
Cl		0,3			0,032	0,4
S	0,05	0,2	4×		0,132	0,8
Mg	2,1	0,04		1,84		0,1
Fe	5,0	0,004		1,92		0,01
Si	28,0	0		21,2		
Al	9,0	0		6,47		

În *fig. 1.* se reprezintă bioelementele în modelele spațiale compacte.

Analiza spectrală a permis identificarea în corpul uman a unui număr de peste 60 elemente *(Vernadski)*, dar majoritatea lor se găsesc în cantități foarte mici, de unde denumirea de OLIGOELEMENTE (oligos = puțin), MICROELEMENTE sau ELEMENTE „ÎN URME" („Trace-elements"). Dintre acestea se pot cita unele prezente la toate speciile (Fe, Zn, Cu, Mn, Ni, Co), altele numai la

H94.215

BIBLIOTECA JUDEȚEANĂ „GH. ASACHI" IAȘI

Scanned with OKEN Scanner

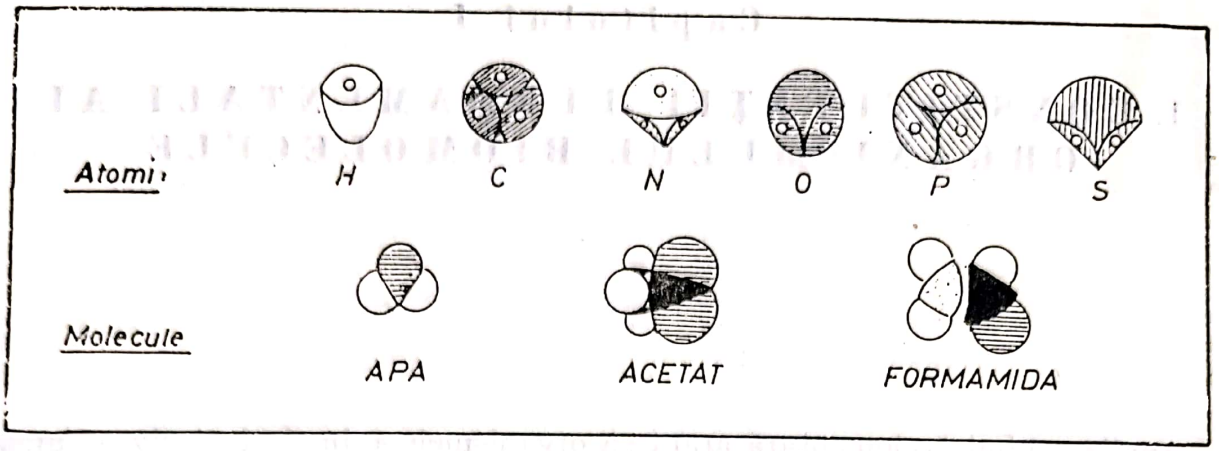


Fig. 1. Reprezentarea atomilor şi moleculelor în modelul spaţial compact

anumite specii, de exemplu, la om (Al, Ti, I, Br, As, Pb, Sn, Mo, V, Si, F) şi care, în general, au un rol esenţial pentru viaţă (în enzime, hormoni etc.).

Compararea răspîndirii elementelor din organisme cu situarea lor în *tabelul lui Mendeleev* relevă că 4 elemente din perioadele 1—2 (H, C, N, O) alcătuiesc 96% din organism; 5 elemente din perioada a 3-a (Na, Mg, P, S, Cl) mai aduc 1,8%, deci, 9 elemente din primele trei perioade intră în proporţie de aproximativ 98% în corpul uman. În ansamblu, elementele cu număr atomic 1—20 reprezintă 99%, iar cele cu număr atomic 21—42, restul de 1% din corpul uman, de unde concluzia că pentru existenţa materiei vii sînt de interes proprietăţile legate de mărimea atomului, importante fiind elementele mai simple, cu greutate atomică mică.

Diferenţa între materia nonvie şi materia vie, şi în cadrul acesteia între plante şi animale, constă în *cantitatea* şi *calitatea* moleculelor compuşilor anorganici, dar mai ales organici *(Tabelul 2)*

TABELUL 2

Repartizarea componenţilor fundamentali la plante, animale, om şi în unele organe şi ţesuturi animale (modificat, după **S. M. Rapoport** (1969); **A. L. Lehninger** (1970); **H. Reinbothe** (1975)).

COMPUŞI	Plante (%)	Animale (%)	Om (%)	Om kg	În organe şi ţesuturi animale (%)					
					Piele	Schelet	Muşchi	Ţesut adipos	Ficat	Creier
Comp. anorganici din care:	*77,5*	*64,3*	*64*	*44,8*						
— Apă	75	60	60	42	58	28	70	23	71	75
— Săruri miner.	2,5	4,3	4	2,8	0,6	27	1	0,2	1,4	1,4
Comp. organici din care:	*22,5*	*35,7*	*36*	*25,2*						
— Glucide	18,0	6,2	1	0,7						
— Lipide	0,5	11,7	15	10,5	14	25	6	71	3	12
— Proteine	4,0	17,8	19	13,3	27	20	22	6	22	11
— Ac. nucleici			1	0,7						
				70 kg						

Dintre compușii anorganici, un rol rol deosebit de important revine *apei*, care se găsește în proporție de aproximativ 60% în corpul uman (70% în inimă, 83% în mușchi) și 98% în alge. Distribuția ionilor (de exemplu a cationilor) este diferită în lichidele intra -și extracelulare *(Tabelul 3)*.

TABELUL 3

Distribuția ionilor (cationi) în lichidul intra- și extracelular (mEq/l) /din I. Manta *și colab.* (1968)

Cationi	*Intracelular*	*Extracelular*
Na^+	10	145
K^+	150	5
Ca^{++}	2	2
Mg^{++}	15	2
Total	177	154

Dintre compușii organici, importanța maximă structurală și/sau energetică o au glucidele, lipidele, proteinele și acizii nucleici, numite și BIOMOLECULE („moleculele vieții") și compușii cu rol în reglarea proceselor biochimice, denumiți BIOCATALIZATORI (vitamine, enzime, hormoni).

Plantele verzi, autotrofe, sînt furnizori primari de glucide (prin fotosinteză, asimilarea clorofiliană) și folosesc glucidele polimere (amidon, celuloză) în construirea pereților celulari sau ca materiale de rezervă. Animalele, heterotrofe, necesită consumarea unei alimentații echilibrată în proteine, glucide, lipide, vitamine, apă, săruri anorganice și oligoelemente. În general, glucidele și lipidele simple servesc ca surse de energie; lipidele complexe în structurarea membranelor celulare și din particulele subcelulare; dintre *biomacromolecule* (biopolimeri), proteinele sînt suportul structurii, funcțiilor și specificității, iar acizii nucleici, purtători ai informației biologice. Apa și sărurile minerale reprezintă mediul reacțiilor biologice și oligoelementele, efectori ai acestor reacții.

În structurarea biomoleculelor participă un număr relativ mic de molecule: „primare": aproximativ 20 aminoacizi, 2 purine și 2 pirimidine, oze și acizi grași, alcătuite din 3—5 bioelemente *(tabelul 4)*.

TABELUL 4

Biomolecule de interes fundamental /după H. Reinbothe (1975)/

Molecule simple	*Compoziția atomică*	*Molecule construite* (exemple)
Oze	C,H,O	Di-, oligo-, și polizaharide; esteri fosforici ai ozelor; glicozide
Aminoacizi	C,O,H,N,(S)	Peptide, proteine, pteridine, porfirine, corrine și alți derivați biogenetici
Purine, pirimidine	C,O,H,N	Nucleozide; nucleozidfosfați; nucleozidfosfațiglucide; polinucleotide (ADN, ARN)
Acizi grași	C,H,O	Grăsimi (lipide) simple și complexe
Mevalonat	C,H. (O)	Terpene, caroteni, sterine

De interes pentru proprietățile chimice (biochimice) ale moleculelor sînt tipurile de legături chimice, care au lungimi diferite *(tabelul 5)* și energii de legare variate *(tabelul 6)*.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 5

Lungimea legăturilor chimice standard şi ale legăturilor de hidrogen (după **L. Stryer** (1975)/

Legătura	Structura	Å	Legătura	Structura	Å	Legătura de Hidrogen	Å
C—H	R_2CH_2	1,07	C=O	Aldehidă	1,22	O—H...O	2,70
	Aromatică	1,08		Amidă	1,24	O—H...O⁻	2,63
	$R—CH_3$	1,10	C—S	R_2S	1,82	O—H...N	2,88
C—C	Hidrocarburi	1,54	N—H	Amidă	0,99	N—H...O	3,04
	Aromatică	1,40	O—H	Alcool	0,97	N^+—H...O	2,93
C=C	Etilenică	1,33	O—O	O_2	1,21	N—H...N	3,10
C≡C	Acetilenică	1,20	P—O	Ester	1,56		
C—N	$R—NH_2$	1,47	S—H	Tiol	1,33		
	O=C—N	1,34	S—S	Disulfură	2,05		
C—O	Alcool	1,43					
	Ester	1,36					

TABELUL 6

Tipuri de legături: energia de legare în moleculele biologice şi importanţa lor /după **T. P. Bennett** (1969); **H. Reinbothe** (1975)/

Tipul legăturilor	*Energia de legare* (kcal/mol.)	*Importanţă pentru:*
Covalente	35—212	— structura biomoleculelor — structura primară: structura covalentă a biomacromoleculelor (biopolimeri) — structura secundară a biopolimerilor (legătura —S—S—) — legarea substratelor şi intermediarilor în complexele multienzimatice
Ionice	40—110	— structura secundară şi terţiară a biomacromoleculelor — legarea enzimă-substrat
De hidrogen	2—7	— structura secundară, terţiară, cuaternară a biomacromoleculelor (ex. conformaţia acizilor nucleici şi proteinelor) — legarea „enzimă-substrat" — împerecherea bazelor din ac. nucleici şi a codonilor-anticodonilor
Van-der-Waals *Hidrofobe*	1—2	— ca la legăturile ionice — conformaţia proteinelor — conformaţia ac. nucleici (în „împachetarea" nucleotidelor din ac. nucleici)

În cazul unei *celule bacteriene (tabelul 7)* se observă că în *materia uscată* (după îndepărtarea apei) principalii constituenţi sînt proteinele (70%), urmate de lipide (care predomină ca număr de molecule deoarece au greutate moleculară mai mică decît proteinele), ele avînd de asemenea un *turn-over* (viteză de refacere) mai ridicată. Biosinteza proteinelor, care implică legarea, în medie, a 500 aminoacizi pe moleculă (cu utilizarea a 3 ATP/1 legătură) se situează ca principalul consumator al energiei de biosinteză (aproximativ 80% din total).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 7

Compoziția chimică și capacitatea de biosinteză a unei celule de Escherichia coli /modificat, după **A. Lehninger** (1972); **H. Reinbothe** (1975)/.

COMPONENT	% din greut. tot.	% din greut. usc.	gr. mol.	Nr. mol/ celulă	Nr. mol. sintetizate pe secundă	Nr. mol. ATP consumați/ celulă	% din energia de sinteză
Apa	70						
ADN	1	5	2×10^9	4	0,033	6×10^4	2,5
ARN	6	10	1×10^6	15.000	12,5	$7,5\times10^4$	3,1
Proteine	15	70	6×10^4	1.700.000	1.400	$2,1\times10^7$	80
Lipide	2	10	1×10^3	15.000.000	12.500	$8,8\times10^4$	3,7
Polizaharide (glucide)	3	5	2×10^5	39.000	32,5	$6,5\times10^4$	2,7
Molecule „bloc" de constituție și intermediari	2						
Ioni anorganici	1						

1.1. GLUCIDELE (HIDRAȚII DE CARBON)

1.1.1. NOMENCLATURĂ. CLASIFICARE

Pentru compușii formați din „zaharuri reducătorare" (oze) sau care prin hidroliză dau asemenea compuși s-a propus *(Bertrand, 1923)* termenul de *glucidă* (glycos=dulce), adoptat de Comisia internațională de Chimie biologică (Cambridge, 1923). Denumirea mai veche de *hidrați de carbon* sau *carbohidrați*, bazată pe faptul că formula brută poate fi exprimată prin numărul atomilor de C și a unui număr de molecule de apă: $C_n(H_2O)_m$ [de exemplu glucoza: $C_6(H_2O)_6$; arabinoza: $C_5(H_2O)_5$] a fost criticată și părăsită, deoarece unii compuși care aparțin acestei clase nu corespund formulei generale [de exemplu, desoxiriboza: $C_5H_{10}O_4$ sau metilpentozele: $C_6H_{12}O_5$]. În schimb, există substanțe care corespund formulei generale dar nu sînt glucide, [de exemplu acidul acetic: $C_2(H_2O)_2$; acidul lactic: $C_3(H_2O)_3$ etc.]

În cadrul acestei clase mari, se folosesc termenii de *oze* sau *monozaharide* pentru glucidele reducătoare nehidrolizabile și de *ozide* pentru moleculele formate din oze (prin combinarea grupării reducătoare) și care prin hidroliză dau cel puțin două oze. Ozidele pot fi alcătuite numai din oze și în acest caz se numesc *holozide*, cu precizarea că cele alcătuite dintr-un număr mai mic, de obicei din 2—6 molecule de oze, se numesc *oligozaharide* (oligozide), iar cele dintr-un număr mai mare, *polizaharide* (poliozide); compușii care pun în libertate prin hidroliză, pe lîngă oze, și o parte nonglucidică („aglicon") se denumesc *heterozide*.

Ozele se clasifică după numărul atomilor de carbon: bioze, trioze, tetroze, pentoze, hexoze (respectiv cu 2, 3, 4, 5, 6 atomi de C) iar oligozaharidele după numărul moleculelor de oze: dizaharide (alcătuite din 2 molecule de oze), trizaharide (din 3 molecule de oze), tetrazaharide (din 4 molecule de oze) etc.

În structura ozelor intră mai multe grupări alcoolice și o funcție carbonilică, sub formă de aldehidă, cînd formează *aldozele* sau cetonică, în cazul *cetozelor*.

În *tabelul 1.1* se schematizează principiile mai importante de clasificare și se menționează tipurile de izomerie.

1.1.2. IZOMERIA ȘI FORMULELE OZELOR

Unei anumite formule brute îi pot aparține mai multe oze diferite, datorită multiplelor posibilități de izomerie: de poziție, stereochimică, optică, de ciclizare.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.1

Principiile de clasificare şi izomeria hidraţilor de carbon

Criteriul de clasificare / *Clasa*	După numărul mol. de oze	După grup. funcţională	După nr. atomi de C	După componenţa moleculară	*Holozide:* după nr. de mol. de oze. *Heterozide:* după natura agliconului	După caracterul reducător:	Tipuri de izomerie
HIDRAŢI DE CARBON sau GLUCIDE	→Oze	aldoze / cetoze	2 3 4 5 6 7 *	holozide / heterozide	oligozaharide (**) / polizaharide	reducătoare / nereducătoare	d; l; dl (+) (−) (α)((β)
	→Ozide				O-heterozide; N- ,, ; S- ,,		piranoze furanoze

* bioze, trioze, tetroze, pentoze, hexoze, heptoze
** dizaharide, trizaharide, tetrazaharide, pentazaharide etc.

Izomeria de poziţie apare începînd cu triozele, care pot fi aldoze sau cetoze:

$$\overset{3}{HOH_2C}-\overset{2}{CHOH}-\overset{1}{CHO}$$
(Aldehida glicerică)

$$\overset{3}{HOH_2C}-\overset{2}{CO}-\overset{1}{CH_2OH}$$
(Dihidroxiacetona)

Cu creşterea numărului de atomi de C apar noi posibilităţi de izomerie de poziţie, după nivelul la care se situează gruparea carbonilică, sau prin eliminarea unui atom de O, care de obicei se constată în poziţia apropiată grupării aldehidice (la C_2) sau la atomul cu indicele cel mai mare; numerotarea începe de la gruparea aldehidică, sau în cazul cetozelor de la C terminal cel mai apropiat de cetonă.

În *tabelul 1.2* se prezintă unele exemple de izomerie de poziţie pentru hexoze şi doi derivaţi „desoxi-".

TABELUL 1.2

Exemple de izomerie de poziţie la hexoze şi derivaţii desoxi −

C: 1	2	3	4	5	6	Denumirea
OHC	−CHOH	−CHOH	−CHOH	−CHOH	$-CH_2OH$	Aldohexoză (de ex. glucoza)
HOH_2C	−CO	−CHOH	−CHOH	−CHOH	$-CH_2OH$	cetohexoză (2) (de ex. fructoza)
HOH_2C	−CHOH	−CO	−CHOH	−CHOH	$-CH_2OH$	Cetohexoză (3)
OHC	$-CH_2$	−CHOH	−CHOH	−CHOH	$-CH_2OH$	Dezoxiglucoza (2)
OHC	−CHOH	−CHOH	−CHOH	−CHOH	$-CH_3$	Dezoxiglucoza (6) (metilpentoze, de ex. fucoza

Scanned with OKEN Scanner

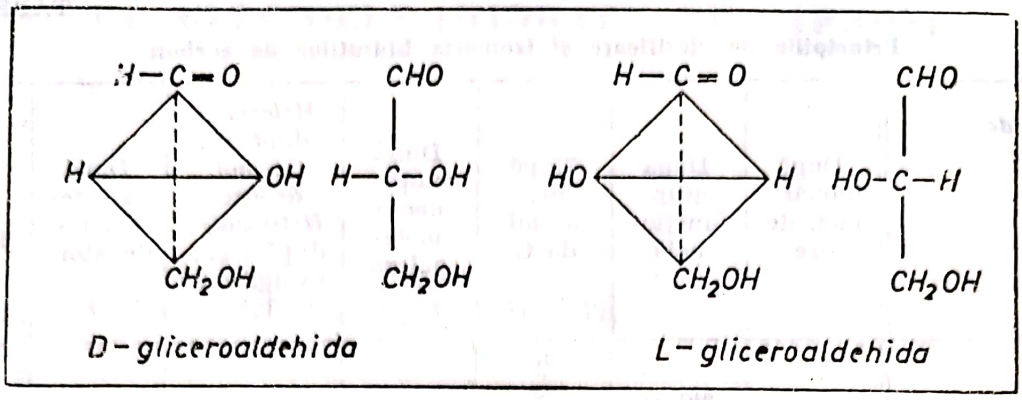


Fig. 1.1. Reprezentarea D- şi L-gliceroaldehidei

Stereoizomeria datorită funcţiei alcool secundar final.

Gliceraldehida (aldehida glicerică, GlyAld) prezintă două configuraţii posibile spaţiale, una cu OH scris în partea dreaptă: *dextro*, D sau d şi cealaltă în stînga: *levo*, L sau l *(E. Fischer)* conform formulelor alăturate *(fig. 1.1)*.

La ozele cu un număr mai mare de atomi de C, situaţia se complică deoarece numărul oxidrililor este mai mare. În acest tip de izomerie (D sau L) se ţine seama numai de poziţia —OH de la C asimetric, cu cel mai mare indice numeric (situat lîngă C final, cu OH secundar).

Stereoizomeria datorită C asimetrici. Considerînd toţi C asimetrici din moleculă, apar noi tipuri de oze, care poartă denumiri specifice notate prin prefixe, astfel:

Nr. at. C asimetrici	*Prefixe:*
1	glicero-
2	eritro-; threo-
3	arabino-; lixo-; ribo-; xilo-
4	allo-; altro-; galacto-; gluco-; gulo-; ido-; mano-; talo-

În *figura 1.2* sînt prezentate schematic aldozele de forma D, cu 3 — 6 atomi de carbon.

Ţinînd seama că imaginile acestor formule în oglindă (adică faţă de un plan de simetrie) reprezintă formele L (aşa cum s-a arătat la gliceraldehidă), seria fiind dată de C asimetric cu cel mai mare indice, rezultă că fiecărei oze din seria D îi corespunde antipodul său din seria L. Numărul acestor izomeri se calculează pe baza numărului de atomi de C asimetrici din moleculă (n) după relaţia: *numărul izomerilor posibili* $= 2^n$; pentru aldopentoze $n = 3$, deci $2^3 = 8$ izomeri; pentru aldohexoze $n = 4$, adică $2^4 = 16$ izomeri (toţi cunoscuţi).

Denumirile menţionate se păstrează şi atunci cînd de C terminali (asimetrici) se leagă alte grupări decît cea aldehidică, precizîndu-se însă conformaţia care corespunde C asimetric. Astfel X şi respectiv Y pot fi, de exemplu

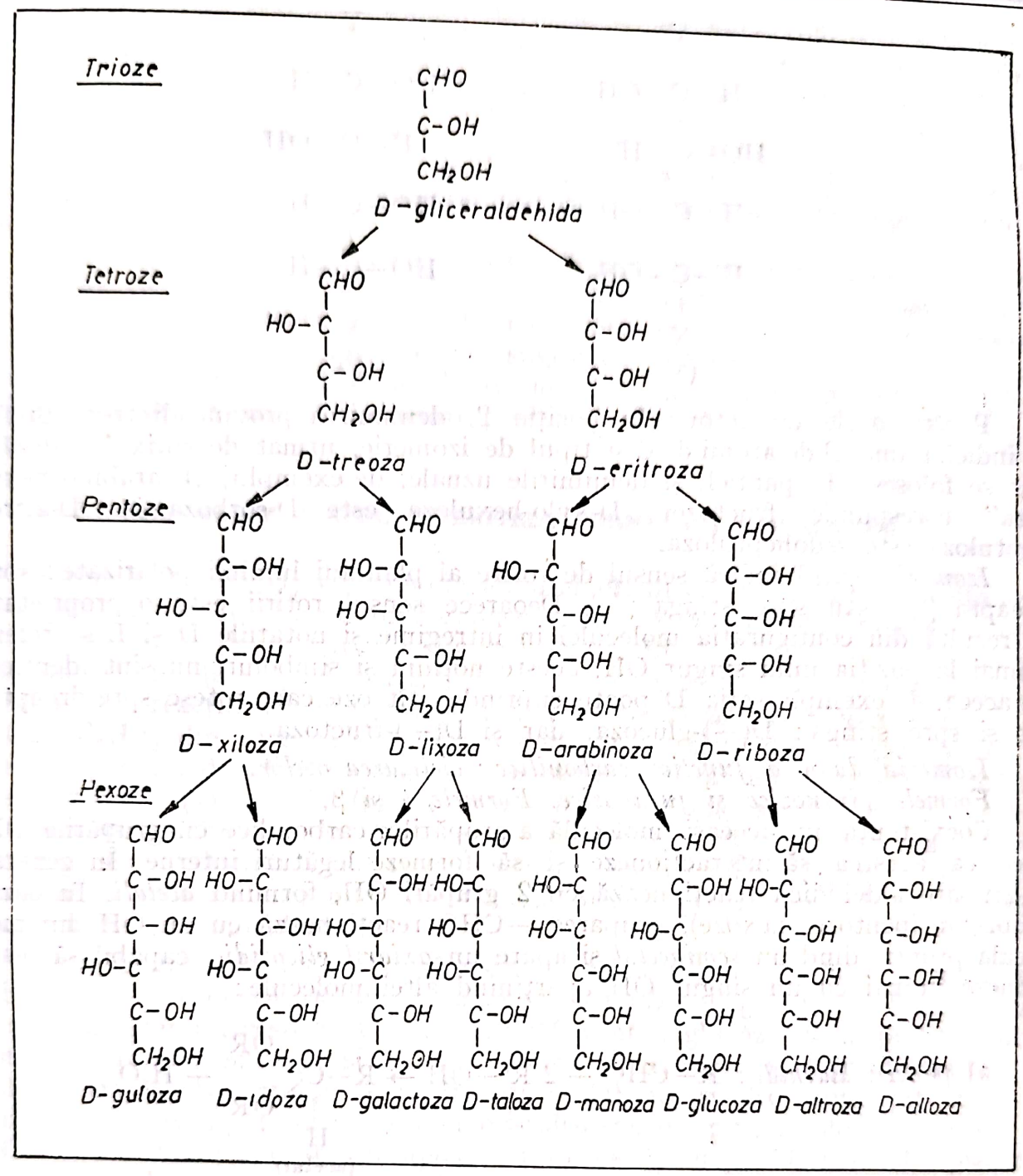
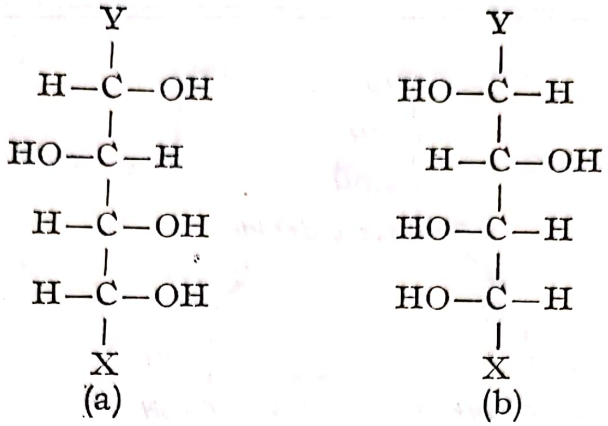


Fig. 1.2. Reprezentarea schematică a D-aldozelor cu 3—6 atomi de carbon, denumirile şi prefixele corespunzătoare.

Nr.at.C asim.	*Prefixele stereoizomerilor ozelor :*
1	glicero-
2	eritro- ; threo(treo-)
3	arabino- ; lixo- ; ribo- ; xilo- ;
4	allo- ; altro- ; galacto- ; gluco- ; gulo- ; ido- ; mano- ; talo-.

CHOH, $CHOCH_3$, CHOAc, $CHNH_2$. Considerînd că toate derivă de la glucoză şi că funcţia principală (de la care începe numerotarea) este în Y, unele vor aparţine seriei *D-gluco*-(a) şi celelalte seriei *L-gluco*-(b).



Pentru ozele cu cetona în poziţia 2, denumirea provine dintr-un prefix ce indică numărul de atomi de C şi tipul de izomerie, urmat de sufixul „*-uloză*", dar se folosesc, în paralel, şi denumirile uzuale, de exemplu, „D-arabino-hexuloza" corespunde fructozei; D-xylo-hexuloza este D-sorboza, iar D-altro-heptuloza este sedoheptuloza.

Izomeria optică indică sensul de rotire al planului luminii polarizate: spre dreapta (+) sau spre stînga (—). Deoarece sensul rotirii este o proprietate ce rezultă din configuraţia moleculei în întregime şi notaţiile D şi L se referă numai la poziţia unui singur OH, aceste noţiuni şi simboluri nu sînt identice, de aceea, de exemplu seria D poate cuprinde atît oze care rotesc spre dreapta, cît şi spre stînga: D(+)-glucoza, dar şi D(—)-fructoza.

Izomeria datorită funcţiei carbonilice: ciclizarea ozelor.

Formele piranozice şi furanozice. Formele α şi β.

Coexistenţa în aceeaşi moleculă a grupărilor carbonilice cu grupările OH, face ca acestea să interacţioneze şi să formeze legături interne. În general, o grupare aldehidică reacţionează cu 2 grupări OH, formînd *acetali*. În cazul aldozelor (pentoze, hexoze), gruparea —CHO reacţionează cu un OH din molecula proprie dînd un *semiacetal* şi apare un *oxidril glicozidic*, capabil să reacţioneze numai cu un singur OH aparţinînd altei molecule:

a) pentru *aldehide*: $R-CHO + 2\,R'-OH \rightarrow R-C(H)(OR')(OR') + H_2O$ (acetal)

b) pentrru *aldoze*: $H-C(OH)(R)-O- + R'-OH \rightarrow H-C(OR')(R)-O- + H_2O$ (semiacetal)

Pentru aldoze, formele mai stabile sînt cele cu legătura 1 — 4, ce corespund furanului (furanozice) şi 1 — 5, ce corespund piranului (piranozice); în mod similar, pentru cetoze, cele cu legături 2 — 5 (furanozice) şi 2 — 6 (piranozice).

Aranjarea atomilor de C în moleculă poate fi scrisă liniar, cu menţinerea grupării —CHO (formule E. Fischer) sau cu indicarea punţii semiacetalice şi

a —OH glucozidic (pseudoaldehidă) (formule E. Fischer—Tollens). Aceste reprezentări nu corespund distanțelor reale dintre atomi, de aceea se preferă formulele *de proiecție* (formulele *Haworth*). În aceste reprezentări, planul moleculei este perpendicular pe foaie (de aceea partea de jos, din față, se scrie uneori mai gros); deasupra și sub acest plan se scriu substituenții atomilor din plan. Oxidrilul rămas liber la C_1 al aldozelor și la C_2 al cetozelor poate ocupa două poziții: α, cînd se scrie sub plan (în jos) și β, deasupra planului (în sus).

Determinări fizice (difracția razelor X sau electronică, spectrul în I.R.) au arătat că dintre cele două forme ale ciclohexanului („vană" sau „cuvă" și „scaun"), hexozopiranozele iau forma scaun, ce se reprezintă în *formulele de perspectivă*. Pentru o ilustrare mai sugestivă se folosesc și alte modele moleculare, de exemplu, „bile-bare" sau modelul „compact". Avînd în vedere cele expuse se pot lua în considerare pentru D glucoză formulele din *figura 1.3.*

1.1.2.1. ARGUMENTE PENTRU DIFERITELE FORMULĂRI ALE OZELOR

Formula liniară (I) corespunde analizei chimice elementare și funcționale și explică unele reacții de oxidoreducere proprii grupării aldehidice, pe care le dau și ozele, de exemplu reducerea Cu^{++}, Bi^{+++}, Ag^{+}, a acidului picric, fericianurii etc. (a se vedea 1.1.3) dar nu pot explica reacția Schiff și mutarotația. În reacția cu etilmercaptalul, glucoza dă un dietilmercaptal: R—$CH(SC_2H_5)_2$ din care se pot obține derivați de tip aldehidic (forma al), în care gruparea aldehidică reprimește proprietatea de a reduce reactivul Schiff. Acest reactiv (soluție de fuxină bisulfitată, incoloră) se recolorează imediat în prezența aldehidelor, în timp ce cu zaharurile reacția are loc numai după un timp mai îndelungat sau prin încălzire, ceea ce relevă faptul că gruparea carbonilică a ozelor este diferită de a aldehidelor propriu-zise, de unde și denumirea de „pseudoaldehide".

Față de formula I care arată patru C asimetrici, în celelalte formule (semiacetalice) se observă *apariția unui nou C asimetric* (C_1) care dă două forme: α și β. Existența acestora a fost dovedită pentru glucoză prin puterea rotatorie (+113,4° pentru α și +18,7° pentru β), precum și prin diferențele în solubilitate, ale punctului de topire, de stabilitate și alte proprietăți fizice și chimice (de exemplu forma α se recristalizează cu p.t., cu descompunere, la 147° din metanol sau soluții apoase și forma β, cu p.t. 148 — 150° prin recristalizare din acid acetic glacial) și prin comportarea față de enzimele specifice.

Dizolvîndu-se de exemplu α-D-glucoză în apă se constată că soluția prezintă inițial o rotație de +113,4°, care scade la 108° (în 5 minute) pentru a se stabiliza în final la 52,7°; dacă se pleacă de la β-D-glucoză, inițial se constată o rotație de +18,7°, care crește, stabilizîndu-se în final tot la +52,7°. Acest fenomen se numește *mutarotație* și denotă *starea de echilibru* a celor două forme α și β în soluție. În cazul aldozelor, atomul C_1 este denumit adesea și *anomeric* și izomerii α și β ca *anomeri*.

În reacție cu alcoolul metilic, aldozele participă printr-un singur OH apărut la C_1 (spre deosebire de aldehide care reacționează cu 2 molecule de alcool metilic) și dau două forme de derivați diferiți: α-metil-glicozid și β-metil-

Scanned with OKEN Scanner

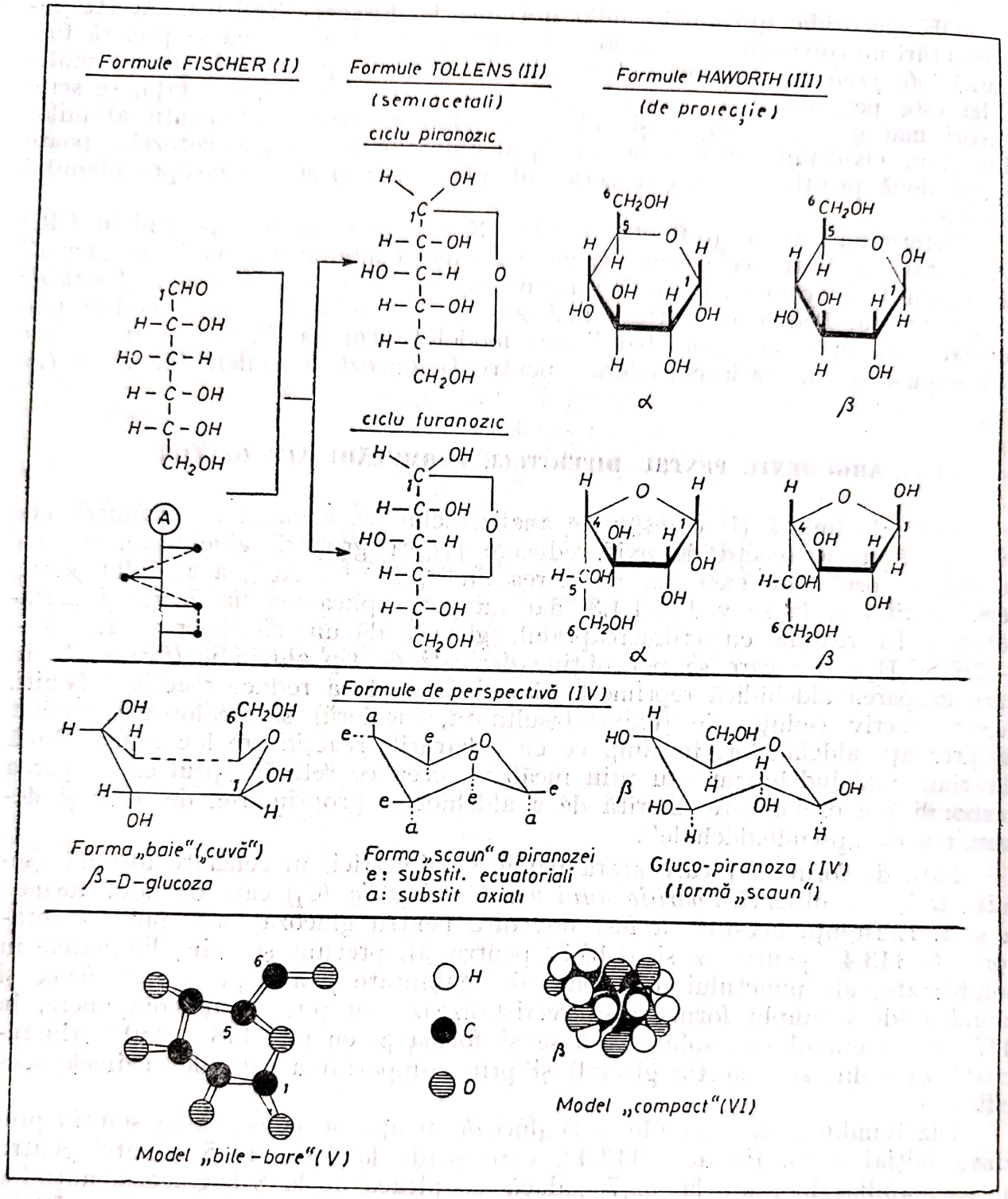


Fig. 1.3. Diverse formulări și modele pentru glucoză

glicozid. Ambii au fost obținuți și caracterizați prin proprietățile lor fizico-chimice și biochimice: primii sînt hidrolizați de enzimele (specifice) α-glicozidaze, ceilalți de către alte enzime, β-glicozidaze. Determinînd conductivitatea soluțiilor, după tratare cu acid boric, s-a observat că creșterea conductivității α-glucozei este mai puternică decît în cazul formei β, ceea ce pledează pentru

situarea în forma α a OH din 1 și 2 de aceeași parte a planului (cis), iar pentru β, pe părți opuse (trans) *(Boeseken)*.

Generalizînd aceste date pentru cele 8 aldohexoze fundamentale *(figura 1.2)*, care pot fi de forma D sau L, rezultă 16 oze diferite, fiecare din acestea putînd fi de forma α sau β (datorită situării H și OH din poziția 1 în mod diferit), deci în total 32 aldohexoze, ceea ce corespunde formulelor care indică 5 atomi de carbon asimetrici (inclusiv C_1) : $2^5 = 32$ izomeri (oze diferite).

După *Hudson*, **puterea rotatorie moleculară** (P.R.M sau M) = $= \frac{\text{puterea rotatorie specifică} \times \text{greut. mol}}{100}$, a unei oze sau a unui derivat este rezultatul a două influențe: una datorită carbonului care are gruparea specifică reducătoare (A), cealaltă, restului moleculei (B). Considerîndu-se, în seria ozelor și ozidelor, derivații α și β (care diferă la aldoze numai prin configurația C_1), puterea rotatorie moleculară a derivatului α va fi A + B, iar aceea a derivatului β va fi B − A, deci:

$$M_\alpha = B + A \text{ și } M_\beta = B - A, \text{ de unde: } A = \frac{M_\alpha - M_\beta}{2} \text{ și } B = \frac{M_\alpha + M_\beta}{2}.$$

TABELUL 1.3

Valoarea $(\alpha)_D$ și P.R.M. în dependență de fracțiunea C_1 (coloana A) și a carbonilor C_2—C_6 (coloana B)

Substanța	$/\alpha/_D$	P.R.M.	A $A = \frac{M_\alpha - M_\beta}{2}$	B $B = \frac{M_\alpha + M_\beta}{2}$
α-D-Glucoză β-D-Glucoza	+113°4 − 19°7	+20°4 − 3°5		11°94
α-Metil-D-glucozid β-Metil-D-glucozid	+158° − 32°	+30°6 − 6°21	18°4	12°2
α-Metil-L-arabinoza β-Metil-L-arabinoza	+ 17° +245°	+ 2°78 +40°18	18°7	
α-Metil-D-galactozid β-Metil-D-galactozid	+196° + 0°6	+38° + 0°1	18°8	
α-Etil-glucozid β-Etil-glucozid	+150°6 − 33°4	+31°3 − 6°9		12°2

Din considerațiile teoretice și măsurătorile efectuate *(Tabelul 1.3)* s-a ajuns la concluzia că A fiind fracțiunea care este sub dependența C_1, aceasta este sensibil constantă, de unde rezultă prima regulă a *izorotației*: rotația relativă a C_1 este puțin afectată de modificările în structura restului moleculei; în cazul compușilor glucidici în care se menține structura C_2—C_6 (coloana B din tabel), se constată că B este sensibil constant, de unde se deduce a doua regulă: modificarea structurii C_1, în numeroși derivați glucidici, afectează puțin rotația datorată restului moleculei.

Scanned with OKEN Scanner

În privința tipului de legătură internă semiacetalică, adică a ciclului furanozic sau piranozic, metodele fizice, chimice și biologice au arătat că, în general, atît pentru aldoze cît și pentru cetoze, formele piranozice sînt mai stabile ca cele furanozice, ultimele găsindu-se în special sub formă de derivați (de exemplu esteri fosforici) sau în ozide (de exemplu, zaharoza este formată din α-D-glucopiranoză și β-D-fructofuranoză). Pentru unele cazuri izolate se menționează și legătura 1 — 6 (de exemplu, în unele heptoze).

1.1.2.2. SIMBOLURI ÎN NOMENCLATURĂ

Pentru denumirea glucidelor (hidrați de carbon) și a derivaților acestora se folosesc atît numirile uzuale, consacrate prin tradiție, cît și unele mai recente, care relevă structura, dar care sînt de obicei destul de lungi, de aceea se recomandă unele simboluri (prescurtări). Astfel, de exemplu, pentru *oze* se utilizează *primele trei litere* ale numelui: Gal = galactoza, Fru = fructoza, Rib = riboza, cu excepția glucozei = G (cu o singură literă). Ciclul furanozic se notează cu *f*, iar cel piranozic cu *p*, de exemplu Man*p* = manozopiranoza. Pentru acizii uronici se folosește sufixul A (acid), după denumirea ozei și a ciclului, de exemplu Gal-f-A = acid galactofuranozic. Pentru derivații 2-amino--2-deoxi-aldonici (destul de frecvenți) se folosește litera N la sfîrșit; gruparea aminică fiind adesea sub formă acetilată, se adaugă în acest caz simbolul Ac, de exemplu, Gal-N-Ac = 2-acetamido-2-deoxi-D-galactoza. Pentru legături speciale se folosesc săgeți polidirecționale, ca de exemplu, în cazul xilanelor:

β-D-Xil*p*-(1 → 4)-(β-D-xil*p*)$_x$-(1 → 4)β-D-xil-(β-D-xil*p*)$_x$
3↑
↑
β-D-xil*p*-(1 → 4)-(β-D-xil*p*)$_x$(1 → 4)β-D-xil*p*

Esterii fosforici, intermediari frecvenți în reacțiile metabolice, se notează prin prescurtarea ozei, cifra care indică locul esterificării și simbolul P sau (P) care corespunde restului $-PO_3H_2$, de exemplu G-1-P sau G-1-(P) = esterul glucozo-1-fosforic; Fru-1,6-di(P) = esterul fructozo-1,6-difosforic.

1.1.3. PROPRIETĂȚI FIZICE ȘI CHIMICE ALE OZELOR DE INTERES BIOLOGIC, FARMACEUTIC ȘI ÎN LABORATORUL CLINIC

Ozele sînt, în general, ușor solubile în apă (cu reacție neutră), greu solubile în alcool și eter și foarte greu solubile în acetonă.

O caracteristică principală este gustul lor dulce (care nu mai apare la polizaharide), așa cum rezultă din *tabelul 1.4.*

Proprietăți chimice.

Principalele reacții chimice ale ozelor, valorificate în identificarea și dozarea ozelor, sînt determinate de grupările carbonilice, de hidroxili și de coexistența acestora în aceeași moleculă, de comportarea lor în mediu acid și alcalin, la care se adaugă metodele enzimatice, cromatografice etc.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.4

Gustul dulce al unor compuşi (relativ) = G.D.

Compus	G.D.	Compus	G.D.
Zaharoza	1,0	Sorbită	0,5
Fructoza	1,5	Glicerină	0,5
Glucoza	0,5	Na-ciclamat	30
Lactoza	0,25	Dulcină	200
Maltoza	0,6	Zaharină	300
Galactoza	0,3	Neohesperidin-dihidro-chalcon	1.500
Zahăr invertit	0,8—1,2	Perilaldehid-alfa-anti-oxin	2.000

Acţiunea acizilor. Prin încălzire cu acizi (HCl, H_2SO_4), pentozele se transformă în furfurol (stabil în mediu acid), hexozele în hidroximetil-furfurol, care se poate descompune la acid levulinic ($CH_3—CO—CH_2—CH_2—COOH$); derivaţii furfurolului se pot uşor polimeriza formînd *humine*, substanţe instabile, de culoare brun-castanie.

Furfurolul şi derivaţii săi se condensează cu diferiţi fenoli sau amine aromatice, formînd substanţe colorate, care stau la baza unor reacţii generale sau specifice pentru zaharuri *(fig. 1.4)*.

Cu *α-naftol*, furfurolul şi derivaţii săi dau o culoare violetă, constituind o reacţie generală pentru glucide (Podobed—Molish—Udranski); cu *resorcina* se obţine o culoare roşie pentru cetoze şi nedefinită (sau incoloră) pentru aldoze *(Selivanoff)*; cu *orcina (Bial)* se pot diferenţia pentozele (culoare vio-

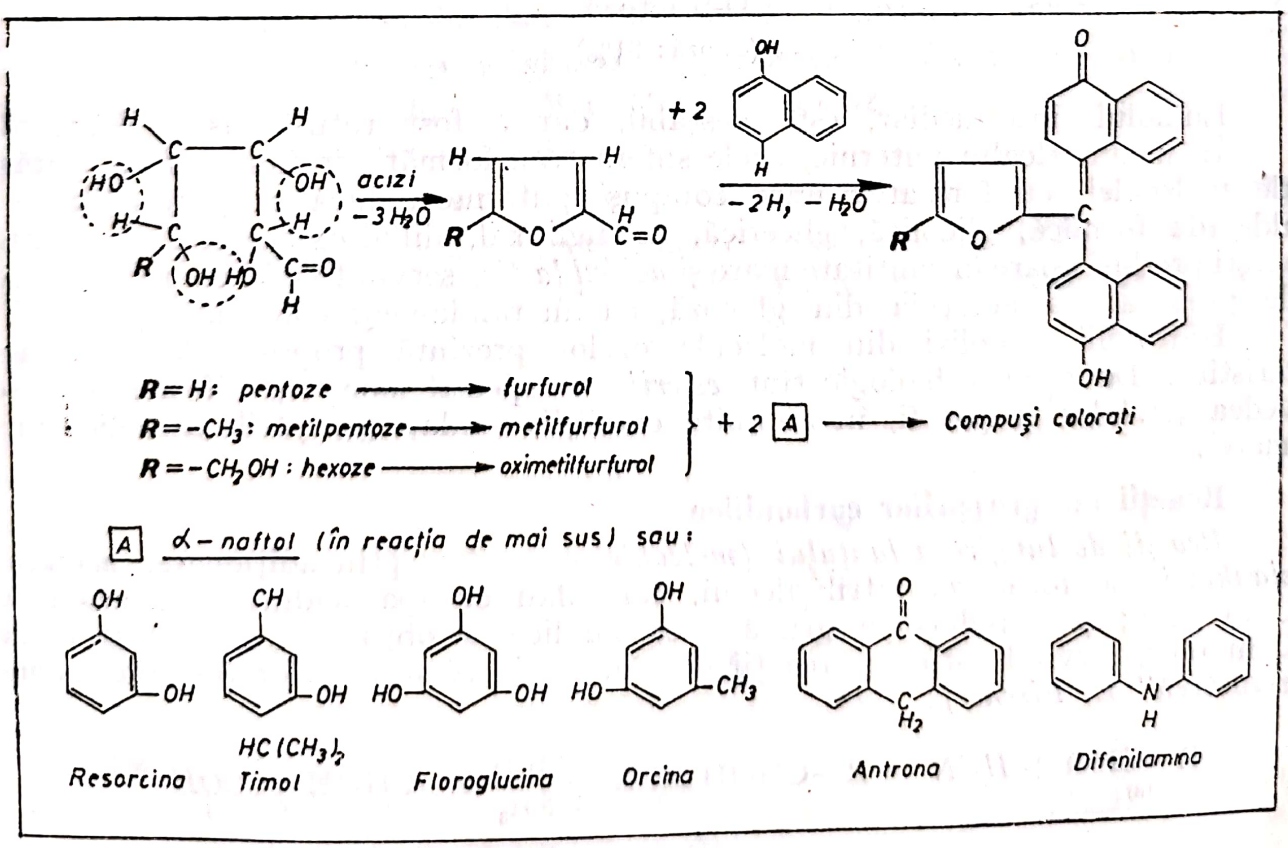
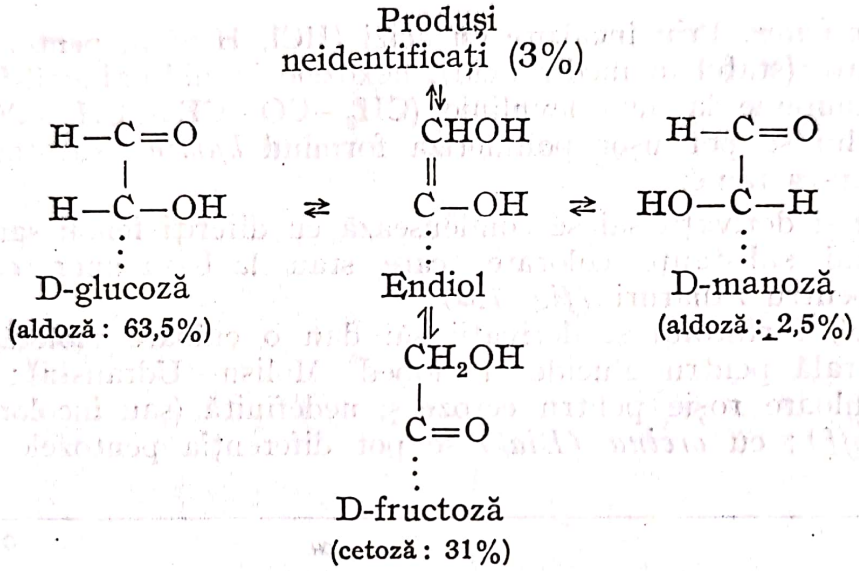


Fig. 1.4. Reacţia furfurolului şi derivaţilor săi cu fenoli şi amine

letă) de hexoze; la fel, şi cu orcină + $FeCl_3$ *(Bial—Sumner)*; cu *pirogalol* sau *floro-glucină (Tollens)*.

Asemenea reacţii sînt mult utilizate în biochimie pentru identificarea şi dozarea ozelor ca atare, din oligozaharide, sau din combinaţiile lor (de exemplu pentozele din acizii nucleici).

Acţiunea alcaliilor (epimerizarea). În soluţii alcaline diluate, de la o anumită ază, apare un amestec în echilibru între cei doi izomeri posibili ai acesteia la nivelul C_2, ai cetozei corespunzătoare şi a unei forme en-diol-1,2, considerată ca intermediarul reacţiei. Asemenea produşi, care nu diferă între ei decît la C_1 şi C_2, restul moleculei fiind identic, poartă denumirea de *epimeri*. Astfel, se cunoaşte următorul amestec de epimeri în echilibru:



Endiolul, intermediar, este nestabil, dar a fost totuşi pus în evidenţă.

În mediu alcalin puternic, ozele suferă transformări profunde, fragmentări ale moleculei, cu formarea unor compuşi puternic reducători (caramelizare): aldehida formică, glicolică, glicerică, metilglioxal, dihidroxiacetonă etc. Între aceşti produşi apare în cantitate mare şi *acidul lactic*, servind astfel ca un procedeu de preparare a acestuia din glucoză, cu un randament convenabil.

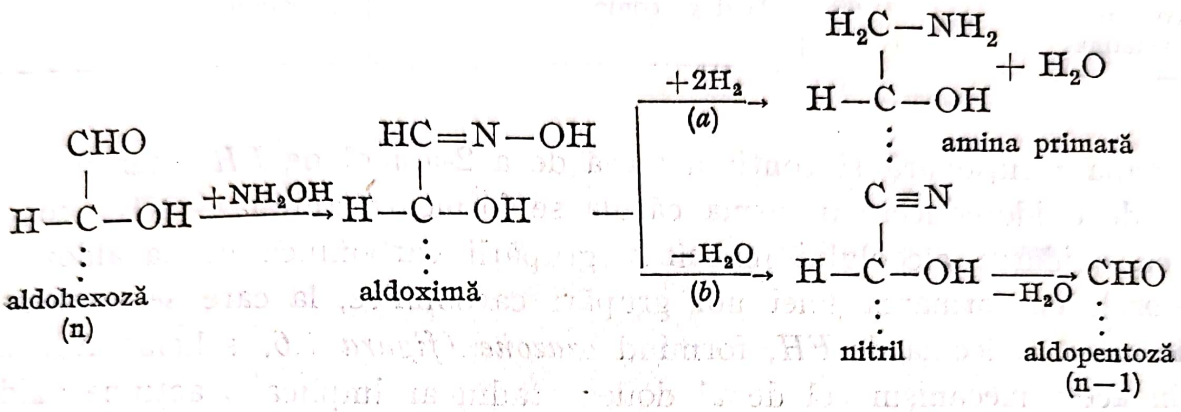
Hidroxilii alcoolici din molecula ozelor prezintă proprietăţile lor caracteristice. De interes biologic sînt *esterii*, în special mono- şi difosforici (a se vedea 1.1.4.4); ei pot fi, în anumite condiţii, oxidaţi (grupările alcoolice primare).

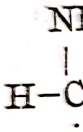
Reacţii ale grupărilor carbonilice

Reacţii de lungire a lanţului (moleculelor) ozelor: prin adiţionarea *acidului cianhidric* se formează nitrili-alcooli, care dau cu apa acidul cu un atom de C în plus; prin reducerea grupării carboxilice se obţin oze cu un atom de C în plus, servind astfel ca reacţii de sinteză *in vitro* a ozelor (reacţia „constructivă" *E. Fischer*):

$$\underset{(n)}{R—CHO} + HCN \rightarrow R—CHOH—CN \xrightarrow[-NH_3]{+2H_2O} R—CHOH—COOH \xrightarrow{red.} \underset{(n+1)}{R—CHOH—CHO}$$

Reacția de scurtare a lanțului (moleculei) ozelor face parte din reacțiile cu aminele. Ozele dau cu *hidroxilamina, oxime.* Acestea (calea *a*), prin reducere (de exemplu cu amalgam de sodiu), conduc la amina primară (de la glucoză se obține glucoxima și prin reducerea acesteia, glucamina); prin deshidratarea oximei (calea *b*) se obține nitrilderivatul (cianhidrină), din care, prin eliminarea HCN, se ajunge la oza cu un atom de C mai puțin (metoda *Wohl*):





Cu *aminele,* aldehidele dau baze Schiff, în timp ce ozele formează *N-heterozide,* în care se păstrează forma ciclică. Reprezentanți de mare importanță biologică ai N-heterozidelor sînt *nucleozidele,* rezultate din oze (de obicei pentoze: riboza, 2-deoxiriboza) și bazele purinice sau pirimidinice. Ele rezistă la alcalii dar sînt hidrolizate de acizi și enzime (nucleozidaze).

Cu *orto-toluidina,* ozele dau baze *Schiff (figura 1.5)* colorate, care servesc la dozarea ozelor (și a glicemiei), măsurătorile făcîndu-se în domeniul 560 — 650 nm (de exemplu, cu filtru Hg 578, Hg 623), cu o bună specificitate pentru diferitele oze *(tabelul 1.5).*

Reacția cu fenilhidrazina. Gruparea carbonilică a aldozelor sau cetozelor reacționează la rece, moleculă la moleculă cu fenilhidrazina (*FH*) formînd *fenilhidrazone.* La cald și cu exces de *FH* (3 mol *FH*/mol oză) reacția trece

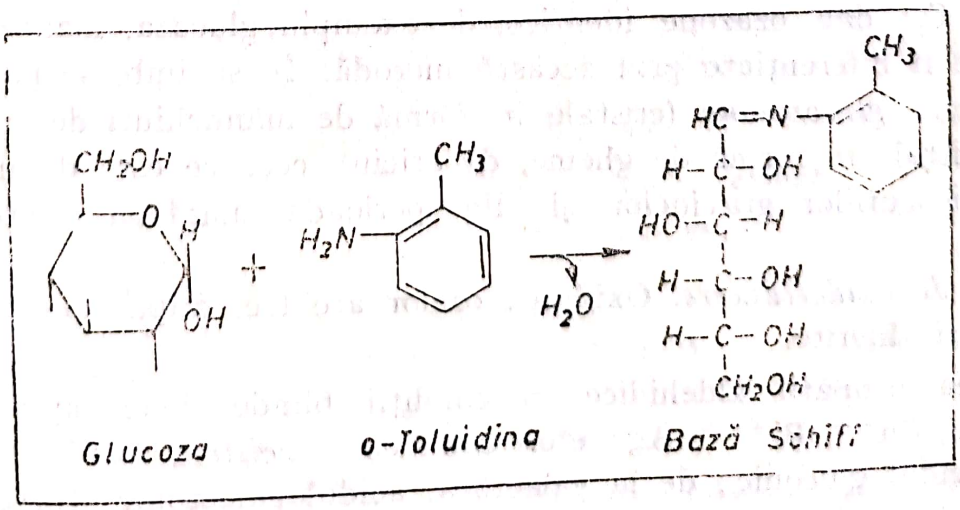


Fig. 1.5. Reacția aldohexozelor cu o-toluidina

TABELUL 1.5

Specificitatea reacției cu o — toluidină

Compus	%	*Compus*	%	*Compus*	%
Glucoza	100	Fructoza	27	Acid ascorbic	2
Galactoza	155	Lactoza	27	Inulină	2
Manoza	106	Zaharoza	7	Acetonă	0
Galactozamina	74	Maltoza	7	Uree	0
Glucozamina	65	Acid gluconic	2	Creatinină	0
Manozamina	64				

prin etapa menționată și continuă: cea de a 2-a mol de *FH* intervine într-un proces de oxidoreducere în urma căruia se formează anilină + NH_3, concomitent cu oxidarea alcoolului învecinat grupării carbonilice (C_2 la aldoze și C_1 la cetoze), cu formarea unei noi grupări carbonilice, la care se condensează cea de a 3-a moleculă de *FH*, formînd *ozazone (figura 1.6,* schema A*)*. Deoarece în acest mecanism cel de al doilea stadiu ar implica o acțiune oxidantă a *FH* și în realitate aceasta se manifestă, de obicei, ca un reducător puternic, s-a propus pe baza „rearanjării lui *Amadori*", o altă interpretare *(figura 1.6,* schema B*)*.

Fenilhidrazonele (cu o singură mol de *FH*) sînt solubile în apă și se pot obține sub formă cristalină, cu aspect și proprietăți specifice, dependente de oza inițială, pe care o pot regenera prin tratare cu unele aldehide, de exemplu din glucozo-fenilhidrazonă cu aldehida benzoică se obține glucoza și benzalhidrazona. *Ozazonele* (care conțin 2 mol *FH*/mol oză) se comportă diferit, deoarece ele nu regenerează oza inițială ci aldocetoze, denumite *ozone* (R—CO—CHO).

Pentru necesitățile diagnosticului în laboratorul clinic se urmăresc *ozazonele*, care pot fi ușor recunoscute prin culoarea galbenă, solubilitate, p.t., forma cristalelor etc. Este de precizat că ozele epimere (care diferă între ele numai prin C_1 și C_2) dau ozazone identice, de exemplu, glucoza, manoza, fructoza, deci nu pot fi diferențiate prin această metodă. În schimb, se poate distinge destul de bine *glucozazona* (cristale în formă de mănuchiuri de spice) de *lactozazonă* (cristale în formă de gheme, de ariciu), ceea ce este de mare interes în cazul glicozuriilor gravidelor și din perioada alăptării (datorite lactozei).

Reacții de oxidoreducere. Oxidarea ozelor are loc, după condiții, la nivele și în moduri diferite.

Oxidarea grupării aldehidice în condiții blînde (de exemplu, cu apă de brom, de iod, Cu^{++}, Bi^{+++}, Ag^{+} etc.) conduce la *acizii „onici"*; de la glucoză se obține acidul gluconic; de la galactoză, acidul galactonic. În soluție apare un echilibru între forma de acid și lactona corespunzătoare *(figura 1.7)*.

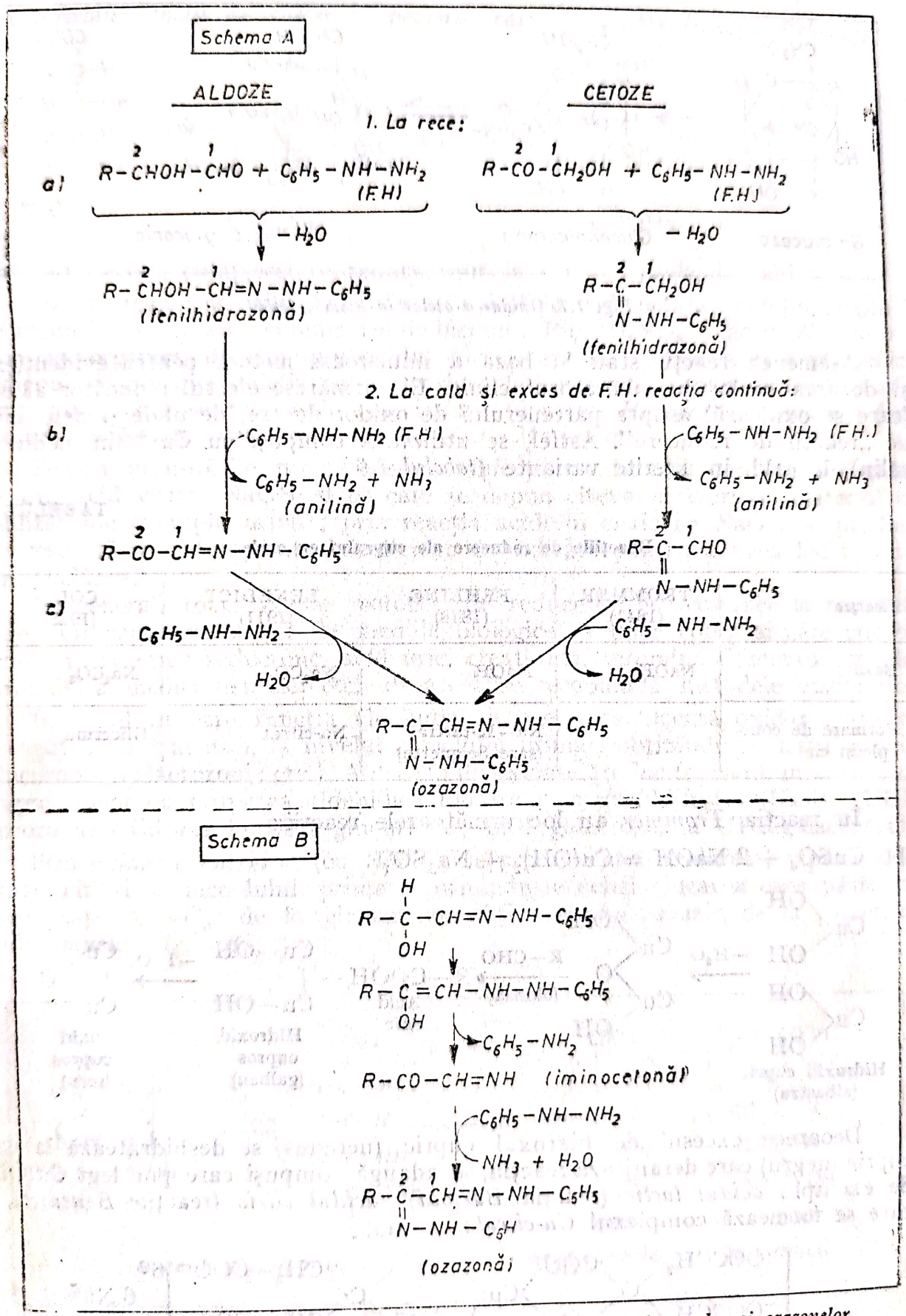


Fig. 1.6. Reacțiile ozelor cu fenilhidrazina. Formarea fenilhidrazonelor și ozazonelor

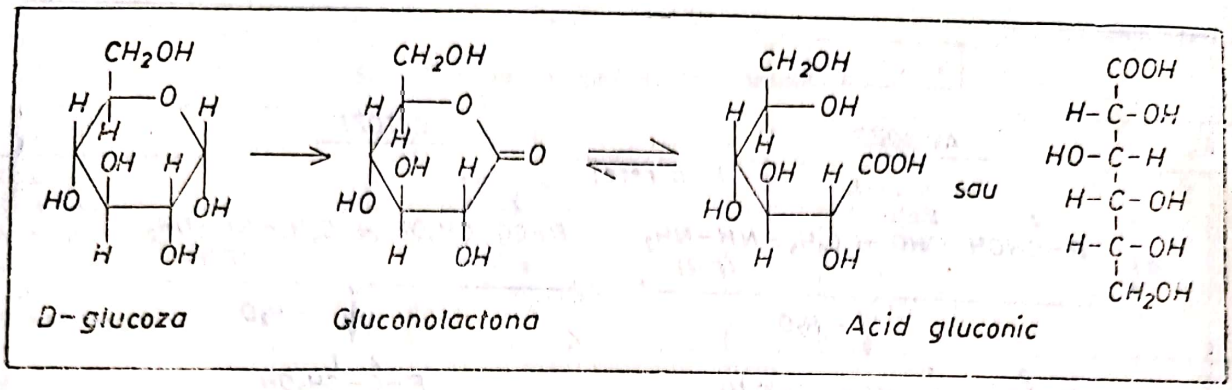


Fig. 1.7. Oxidarea ozelor la acizi „-onici"

Asemenea reacţii stau la baza a numeroase metode pentru evidenţierea şi dozarea ozelor în laboratorul clinic. Ele urmăresc efectul reducător al ozei (care se oxidează) asupra partenerului de oxidoreducere, de unde şi denumirea de „reacţii de reducere". Astfel, se utilizează compuşi cu Cu^{2+} (în mediu alcalin), la cald, în diferite variante *(tabelul 1.6)*.

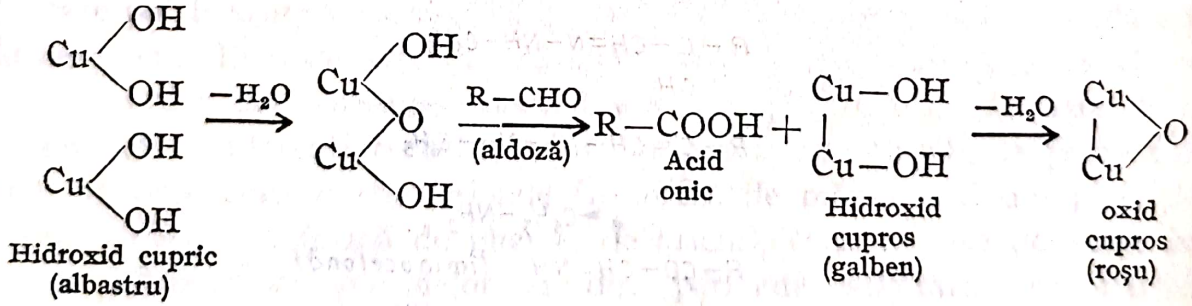
TABELUL 1.6

Reacţiile de reducere ale cuprului cu ozele

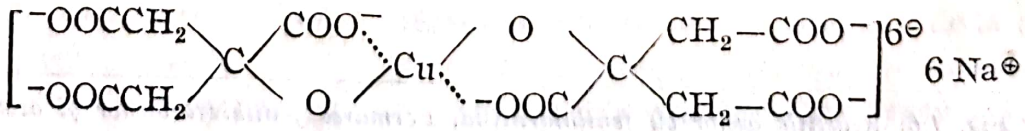
Reacţia	TROMMER (1841)	FEHLING (1848)	BENEDICT (1911)	COLE (1925)
Bază	NaOH	NaOH	Na_2CO_3	Na_2CO_3
Formare de complecşi cu	—	Na—K-tartrat (sare Seignette)	Na-citrat	Glicerină

În reacţia *Trommer* au loc următoarele reacţii:

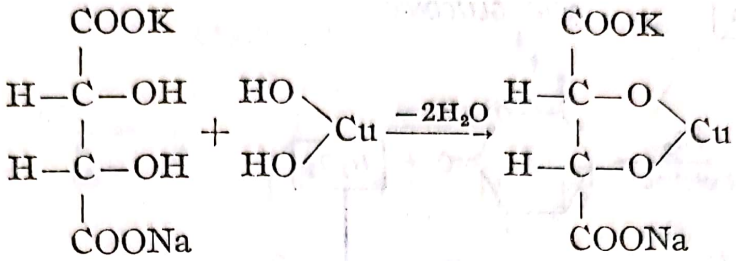
$$CuSO_4 + 2\,NaOH = Cu(OH)_2 + Na_2SO_4$$



Deoarece excesul de hidroxid cupric (neredus) se deshidratează la oxid cupric (negru) care deranjează reacţia, se adaugă compuşi care pot lega $Cu(OH)_2$ de exemplu *acidul lactic* (reacţia *Barfoed*); *acidul citric* (reacţia *Benedict*), în care se formează complexul *Cu-citrat*:



sau *tartratul dublu de sodiu și potasiu*, sarea Seignette (reacția *Fehling*):



Cu^{2+} din acești complecși se reduce ușor la Cu^{+} cu ozele, la cald.

În alte reacții se utilizează reducerea Ag^{+} la Ag^{0} metalic (reacția „oglinzii de argint" sau *Tollens*); subnitratul de bismut: $Bi(OH)_2NO_3$ (reacția *Nylander*); compuși organici, de exemplu acidul picric care se reduce la acid picramic; indigoul, de culoare violetă, care se reduce la compusul incolor (leucoderivat); fericianura, care se reduce la ferocianură (dozarea *Hagedorn—Jehnsen*); fericianură de K/acid picric (dozarea *Ionescu—Matiu*) etc.

Pentru necesitățile practice s-au confecționat tablete care conțin sulfat de Cu, acid citric, NaOH și pe care se depun cîteva picături de material de analizat (de exemplu urină); prin reacția acidului citric cu NaOH se produce efervescență și o temperatură suficient de ridicată pentru a avea loc reacția, fără încălzire.

În general, toate aceste metode „de reducere" pot conduce la rezultate false, din cauza prezenței (în mediile biologice) a unor compuși care pot interfera în reacție: reductone, acid uric, creatinină, vitamină C, metaboliți (glucuronide) ai medicamentelor etc., de aceea se recomandă metodele enzimatice.

În cazul în care funcția aldehidică a ozei este blocată, oxidarea are loc la capătul opus al ozei, la nivelul alcoolului primar, obținîndu-se *acizii uronici* (glucuronic, galacturonic etc.). Acest tip de oxidare are loc frecvent în organism, asupra ozelor cu gruparea aldehidică blocată prin uridildifosfat (UDP); UDP-glucoza se oxidează la UDP-glucuronic; UDP-galactoza, la UDP-galacturonic.

Prin *oxidarea energică*, (cu HNO_3), se produce atît oxidarea grupării aldehidice cît și a alcoolului primar, formîndu-se acizii glucarici care păstrează configurația C_2—C_6; de la glucoză se obține *acidul zaharic*, de la galactoză, acidul *mucic (fig. 1.8)*.

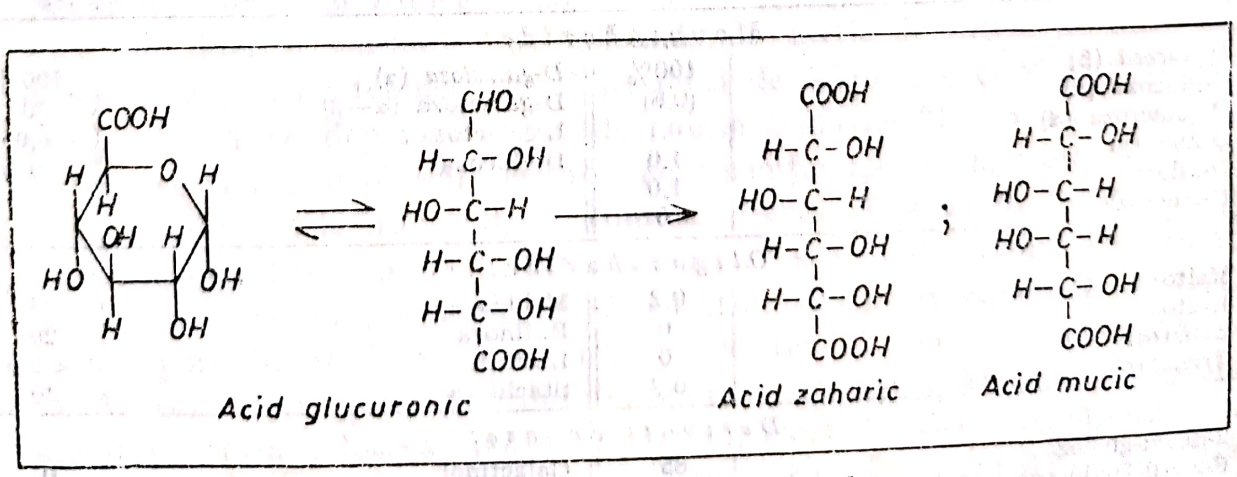


Fig. 1.8. Oxidarea mai energică a ozelor

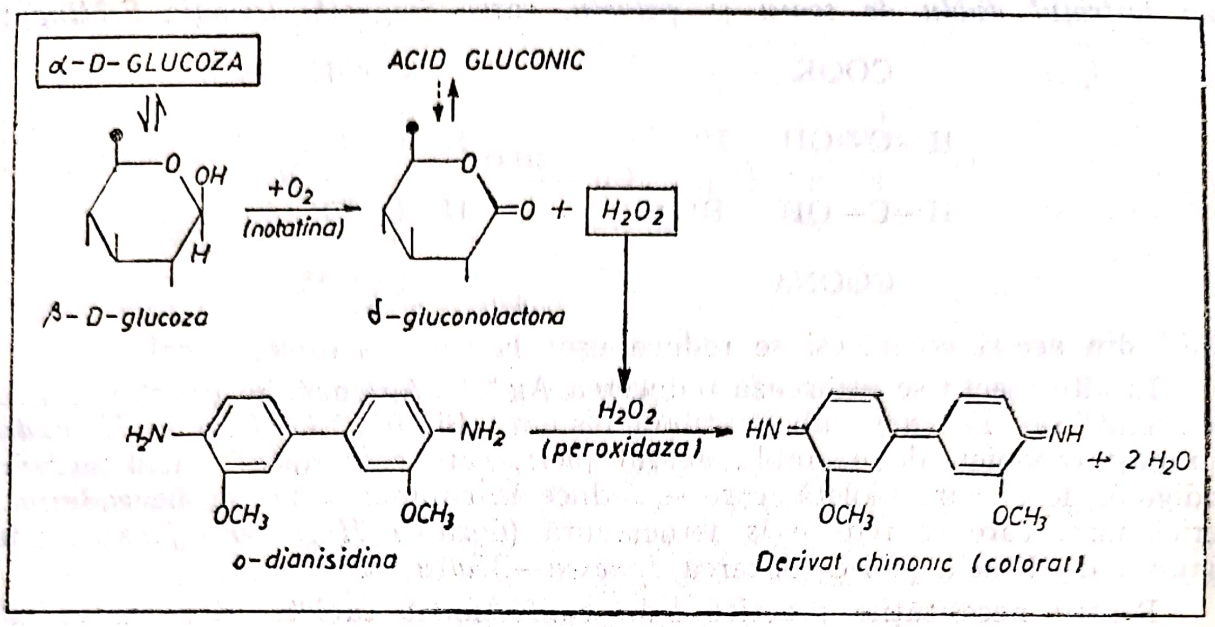


Fig. 1.9. Mecanismul reacției enzimatice cu glucozooxidaza (notatina), peroxidază și o-dianisidină pentru determinarea glucozei

Reacții enzimatice. Din culturile de *Aspergillus* și *Penicilium* s-a obținut o *glucozooxidază*, denumită și *notatină* (de la Penicilium notatum) care oxidează specific β-glucoza *(tabelul 1.7)* la gluconolactonă. Concomitent se formează cantități echivalente de H_2O_2 care se determină în prezența unei peroxidaze, cu ajutorul unor cromogeni, de exemplu o-dianisidina *(figura 1.9)*. Prima reacție este specifică, dar a doua este nonspecifică; alături de cromogenul utilizat (o-dianisidină, o-toluidină) pot interveni diferiții donori de H (acid uric, ascorbic, combinații tiolice, medicamente) care falsifică rezultatele (valori mai mici). În mod similar, pentru determinarea *galactozei* se utilizează ca enzimă *galactooxidaza* din *Dactylium dendroides I (tabelul 1.7)*.

TABELUL 1.7

Gradul de specificitate al glucozooxidazei („Notatina" din Penicillium notatum) și a galactozooxidazei (din Dactylium dendroides I)

GLUCOZOOXIDAZA	Specif.	GALACTOZOOXIDAZA	Specif.
Monozaharide:			
D-glucoză (β)	100%	*D-galactoza* (α)	100%
D-glucoza (α)	(0,6)	D-galactoza (α—β)	30
D-galactoza (α)	0,1	L-galactoza	<0,05
D-manoza	1,0	D-glucoza	0,05
D-xiloza	1,0		
D-fructoza	0		
Oligozaharide:			
Maltoza	0,2	Melibioza	25
Lactoza	0	Rafinoza	20
Zaharoza	0	Lactoza	<0,05
Trehaloza	0,3	Stachioza	20
Derivați de oze:			
2-deoxi-glucoza	85	Galactinol	10
6-metil-D-glucoza	1,8		

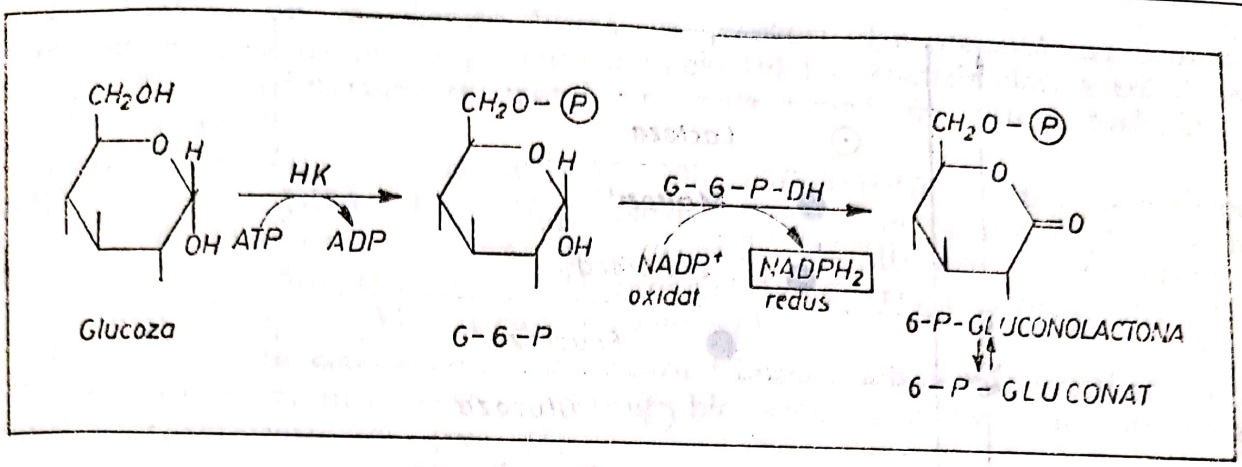


Fig. 1.10. Mecanismul reacției cuplate cu hexochinază (HK) și glucozo-6-fosfat-dehidrogenază (G-6-P—DH) în „testul optic" pentru determinarea glucozei

În laboratorul clinic se utilizează benzi de hîrtie de filtru sau baghete de masă plastică, impregnate cu reactivii respectivi, care, în contact cu lichidul cercetat (urină), se colorează; din aprecierea culorii cu ajutorul unor etaloane se pot obține date semicantitative, suficiente pentru testele *screening* și pentru urmărirea evoluției bolii (diabet) chiar de către pacient.

În alte metode se utilizează sistemul *hexochinază (HK)/glucozo-6-fosfat-dehidrogenază* (G-6-P-DH) *(figura 1.10)*. Prima reacție, de fosforilare a glucozei în prezența *HK* nu este specifică (este dată și de manoză, fructoză etc.), dar acest incovenient este eliminat prin folosirea celei de a doua enzime, G-6-P-DH, *specifică* numai pentru substratul ei (G-6-P) și nu pentru Fr-6-P, Man-6-P. Aprecierea reacției se face prin măsurarea reducerii $NADP^+$ la $NADPH + H$, în U.V. (test optic).

Asemenea reacții enzimatice stau la baza metodelor automatizate care permit determinarea rapidă a glucozei din sînge.

Metode cromatografice

Separarea ozelor și ozidelor din amestec beneficiază de metodele cromatografice, în diferite variante: pe coloană, pe hîrtie de filtru, pe plăci etc. Ca exemplu menționăm tehnica rapidă pe plăci de Kieselgur G (8,5 × 10 cm): pe linia de start se depun soluțiile de oze și etaloane (2 — 5 μl) și se irigă cu un amestec de acetat de etil: izopropanol: soluție apoasă de acetat de sodiu (0,02 M), în raport de 16:6:3, în volume *(Stahl, Kaltenbach, 1962)*. După migrarea necesară (10 — 20 min), plăcile se usucă și se pulverizează cu lichidul de relevare, de exemplu, amestec de alcool etilic (96°): anisaldehidă și H_2SO_4 conc., în raport de 90:5:5, în volume. Aprecierea se face prin determinarea R_f-ului (raportul între distanța frontului spotului ozei și a frontului lichidului de migrare) și prin culoarea spoturilor. Astfel, fructoza ($R_f = 0,34$), zaharoza ($R_f = 0,23$) și maltoza dau spoturi violete; glucoza ($R_f = 0,37$) și riboza,

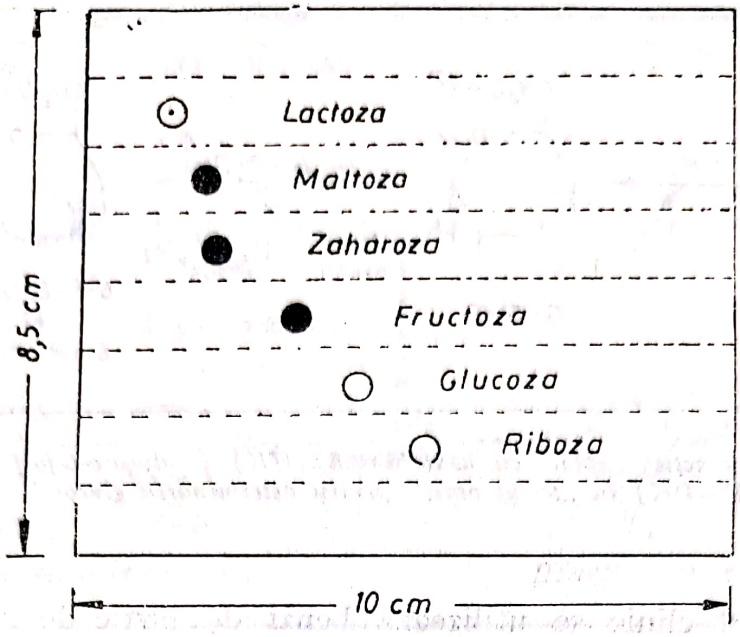


Fig. 1.11. Identificarea ozelor și dizaharidelor prin cromatografie pe strat subțire

spoturi albastre pînă la albastru-verde, iar manoza, lactoza și galactoza, verzi. Metoda permite decelarea unor cantități de minimum 0,05 μg, dar se recomandă pentru cantități de 1 μg *(figura 1.11)*.

1.1.4. GLUCIDE (HIDRAȚI DE CARBON) ȘI DERIVAȚII LOR, SUBSTRATE ALE REACȚIILOR BIOCHIMICE ȘI DE INTERES FARMACEUTIC

1.1.4.1. OZE (MONOZAHARIDE)

Bioze.

Singurul reprezentant și totodată cea mai simplă oză este aldehida glicolică: $HOCH_2—CHO$.

Trioze.

Începînd cu triozele, ozele pot avea gruparea aldehidică sau cetonică: *gliceraldehida* (GlyAld): $HOCH_2—CHOH—CHO$ (de formă D) și respectiv *dioxiacetona* (DOA): $HOCH_2—CO—CH_2OH$ (nu are izomeri).

Tetroze.

După poziția OH din 2 și 3, aldotetrozele pot apare sub formă de *eritroză* sau *treoză (fig. 1.2)*. Ele formează ușor polimeri, de aceea nu apar, de obicei, libere în țesuturi. În cursul metabolismului intermediar pot fi găsite, sub formă de esteri fosforici, la alcoolul primar (C_4).

Pentoze.

Considerînd structura de bază *(fig. 1.2)* sînt posibile patru pentoze: riboza, arabinoza, xiloza și lixoza (fiecare de formă D și L) și după natura grupării carbonilice: aldoze și cetoze; de asemenea pot apare pentoze modificate de exemplu desoxipentozele.

D(—)-riboza nu se găseşte liberă în ţesuturi, dar prezintă un deosebit interes biologic, ca parte componentă a nucleotidelor, coenzimelor, acizilor nucleici (ARN) şi ca intermediari metabolici, sub formă de esteri fosforici ai β-ribofuranozidelor.

Desoxiriboza este componentul glucidic caracteristic acizilor desoxiribonucleici (ADN sau DNA). Datorită grupării $-CH_2-$ din poziţia 2 prezintă un caracter reducător care face ca, spre deosebire de alte oze, să recoloreze la rece fuxina bisulfitată (reactiv *Schiff*), proprietate ce serveşte evidenţierii ADN-ului şi diferenţierii de ARN (reacţia *Feulghen*).

D-ribuloza este cetoza corespunzătoare ribozei; sub forma esterilor mono- şi difosforici ia parte în procese importante biologice, ca de exemplu, fotosinteză, şuntul pentozofosfatic etc. (vol. II).

L(+)-arabinoza este răspîndită în vegetale sub formă de polizaharide denumite *arabane* (în gumele de cireş, prun etc.) de unde se poate obţine prin hidroliză. Nu este fermentată de drojdie şi nu este metabolizată în organism (dă pentozuria alimentară).

D(—)-arabinoza se obţine prin hidroliza heterozidelor antrachinonice din aloe sau prin degradarea D(+)-glucozei.

D(+)-xiloza, numită şi „zahăr de lemn", se găseşte liberă în cantităţi mici în unele fructe (zarzăre), dar este destul de răspîndită sub formă de polizaharide denumite *xilane*, în lignină (paie, lemne). Se poate obţine prin hidroliza polizaharidelor din cocenii de porumb.

Deoarece este foarte puţin metabolizată în organism şi se elimină ca atare prin urină, serveşte pentru aprecierea capacităţii de absorbţie a ozelor; după ingerarea a 25 g xiloză se constată în urină, în primele 5 ore, o cantitate de 5 — 8 g la persoanele normale şi numai 1 — 3 g în cazuri de absorbţie defectuoasă.

Metilpentozele, deşi au 6 atomi de C, sînt considerate ca pentoze, deoarece un atom de C apare sub formă de metil şi nu corespund formulei generale a glucidelor: $C_n(H_2O)_m$. Au, la fel cu hexozele aldehidice, patru centri de asimetrie şi pot da 8 oze diferite, cu 16 enantiomeri, dintre care unii se obţin numai prin sinteză. Dintre metil-pentozele naturale se pot menţiona *L-ramnoza* şi *fucoza* (6-deoxigalactoza), care intră în structura unor polizaharide microbiene şi în glicoproteide.

În *figurile 1.2* şi *1.12* sînt prezentate formulele unor pentoze de interes biologic.

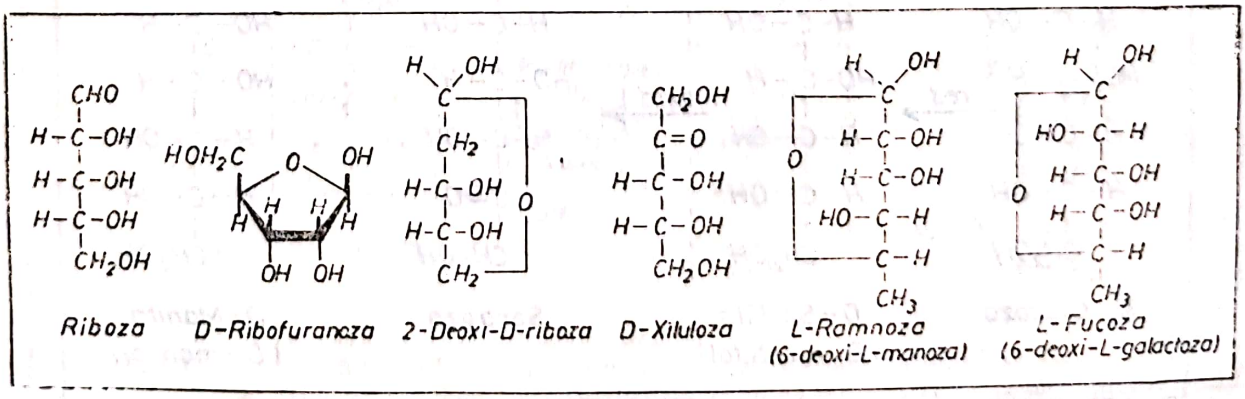


Fig. 1.12. Formulele unor pentoze de interes biologic

În legătură cu *biogeneza* metilpentozelor se ridică unele probleme care nu au primit încă un răspuns satisfăcător. Astfel, s-ar putea admite că ele rezultă prin reducerea hexozelor la nivelul grupării alcoolice primare, dar această ipoteză nu corespunde realității deoarece ramnoza naturală (cea mai răspîndită metilpentoză) care ar proveni prin reducerea manozei este de formă L, în timp ce generatorul său prezumtiv, manoza naturală, este de forma D (L-manoza nu se găsește în natură). La fel, fucoza (destul de răspîndită) ar trebui să provină din L(—)-galactoză, care însă nu se găsește aproape deloc în natură; izorhodeoza, care ar proveni, după această ipoteză, prin reducerea glucozei, nu se găsește în natură.

Hexoze.

D(+)-glucoza (fig. 1.3) este foarte răspîndită în regnul vegetal și animal și este principala oză a organismului uman. Se găsește atît sub formă liberă, cît și în structura oligozaharidelor (zaharoză, lactoză, trehaloză), polizaharidelor (amidon, glicogen) și sub formă de derivați (esteri fosforici, glucozamină etc.). Se prepară prin hidroliza acidă sau enzimatică a amidonului sau zaharozei.

După cum s-a arătat anterior (1.1.2) poate să existe sub forma α și β. Anomerul β se obține aproape pur prin încălzirea unei soluții de glucoză (concentrată) la 100° timp de 2 h în vid (93% β-glucoză, cristalizabilă) sau prin cristalizare din piridină sau alcool amoniacal.

Glucoza este prevăzută în F.R.IX sub denumirea de *Glucosum* (sinonime: *dextroză, saccharum amylaceum*) ca o pulbere albă, cristalină, higroscopică, fără miros, cu gust dulce. O parte glucoză se solvă în o parte apă (soluție neutră), în 150 p alcool; greu solubilă în eter și foarte greu solubilă în acetonă.

Puterea rotatorie $[\alpha]_D^{20°} = +51{,}5°$ pînă la $+53°$ (c = 10% în apă cu 1 ml amoniac diluat).

Pentru identificare se utilizează reacția Fehling, reacția cu azotat de argint amoniacal și reacția cu fenilhidrazina.

F.R.IX prevede soluțiile injectabile de glucoză, *injectio glucosi* cu 20, 33 și 40% glucoză în soluție apoasă și HCl 0,1 n (pH = 3,0 — 5,0).

Prin reducere (de exemplu, cu H_2/Ni), D-glucoza se transformă în polialcoolul *sorbitol* (sorbită), care prin oxidare cu *B. xilinum* sau *Acetobacter suboxidans* trece în *sorboză*, care servește în sinteza vitaminei C. *(figura 1.13 și 2.80).*

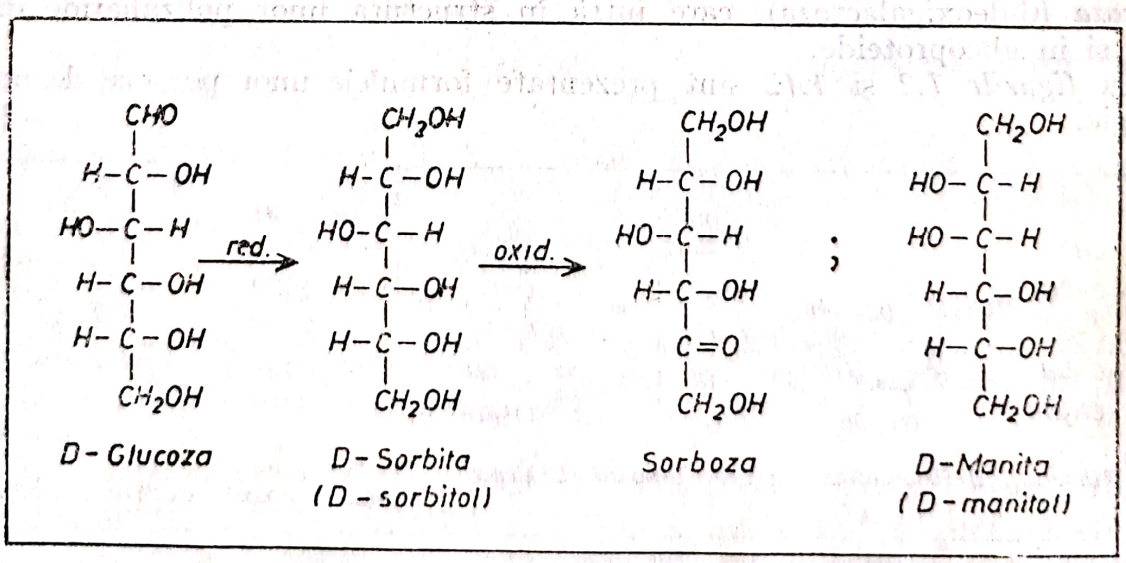


Fig. 1.13. Formulele unor alcooli ai ozelor

Scanned with OKEN Scanner

Sorbitolul se utilizează în terapie în dischinezia biliară, în stimularea peristaltismului intestinal și ca înlocuitor al zahărului la diabetici. În organism, de exemplu, în veziculele seminale, ficat, se oxidează, sub influența dehidrogenazelor, la glucoză și fructoză.

Tween 80 (sorbimacrogoli oleas 300; oleat de sorbimacrogol 300; sorbitaethenum oleinicum; monooleat de polietilenglicol 20 sorbitan; polisorbat 80) din F.R.IX este un tensioactiv anionic, constituit dintr-un amestec de monoesteri oleici ai sorbitolului și ai mono- și dianhidridelor acestuia (sorbitani), copolimerizați cu aproximativ 20 molecule de oxid de etilen pentru fiecare moleculă de sorbitol sau sorbitan, cu gr. mol. a fiecărei catene polioxietilenice în medie de circa 300. Este utilizat ca emulgator pentru uleiuri și vitaminele liposolubile.

D(−)*Manitolul*, epimerul sorbitolului, ce corespunde manozei are $(\alpha)_D^{20} = +23°$ până la 24° și p.t. 165−169°.

Acidul glucuronic prezintă un interes deosebit în *glucuronoconjugare*, proces prin care ficatul intervine în eliminarea unor compuși străini sau produși în intestin, ca de exemplu, fenoli (rezultați în intestin sub influența florei microbiene din aminoacizii aromatici); indoxil (format din triptofan), medicamente (cloral, mentol, salicilați etc.), toxice accidentale; de asemenea asupra unor hormoni elaborați normal în organism (sexuali, corticosuprarenali, tiroidieni). Rinichiul efectuează procese similare pentru eliminarea compușilor cu grupări fenolice, sub formă de β-D-glucuronide (levogire).

D-manoza se găsește mai ales în structura unor polizaharide (manane, galactomanane, glicoproteide), sub formă de manozidă a mioinozitolului în fosfolipidele microbiene sau legată cu N-metil-glucozamina în streptomicina B.

Desoxi-6-L-manoza este *ramnoza* (menționată la metilpentoze), răspîndită în vegetale și ca un constituent al polizaharidelor microbiene.

D(−)-Fructoza (*Fructosum*, F.R. IX) rotește puternic planul luminii polarizate spre stînga; inițial $(\alpha)_D^{20}$ este de −133° pentru a deveni −92° la echilibru, de unde și denumirea de *levuloză*. Are un gust mai dulce decît zaharoza și glucoza (tab 1.4) și se găsește răspîndită liberă în fructe și intră în structura zaharozei, rafinozei, gențianosei, inulinei. În sînge se găsește în cantități mici (cîteva mg la 100 ml); plasma seminală conține 2 — 3 g/litru, cu originea în veziculele seminale. În spermă este însoțită de acidul citric, mioinozitol etc., ceea ce arată o asemănare cu compoziția sucurilor de fructe.

Fructoza liberă (izolată, cristalizată) este de formă piranozică, dar în combinațiile sale este furanozică *(figura 1.14)*; în soluție apoasă se stabilește un

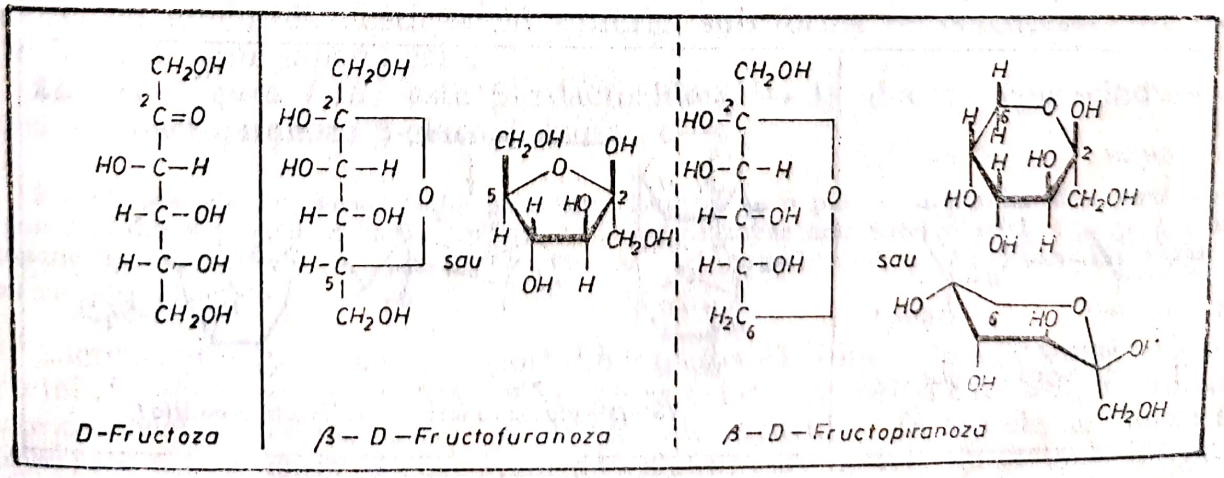


Fig. 1.14. Formule pentru fructoză

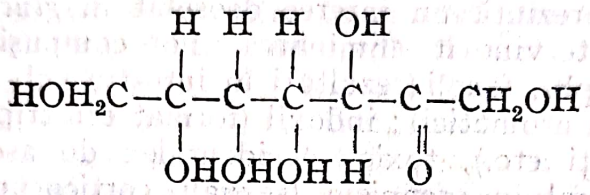
echilibru, de exemplu 90% piranoză şi 10% furanoză, dar proporţia lor variază în raport de concentraţie, temperatură, solvent, pH etc.

Galactoza naturală apare atît în formă L, cît şi D. Se găseşte în cantităţi foarte mici în sînge, lichidul cefalorachidian, urină, şi în cantităţi mari sub formă de combinaţii: lactoza (în lapte), rafinoza, stachioza, pneumogalactane (în plămînul bovinelor), arabo- şi galactomanane (în galactolipide).

6-Deoxigalactoza este *fucoza* (metilpentoză).

Heptoze.

Heptozele au un singur reprezentant de interes biologic, *sedoheptuloza*, izolată din *Sedum spectabile*, dar care apare şi ca intermediar în unele căi de metabolizare ale glucidelor (vol. II); cu formula:



1.1.4.2. OLIGOHOLOZIDE (OLIGOZAHARIDE)

Diholoziде (Dizaharide)

După felul cum sînt implicate, în legarea celor două oze, o singură grupare carbonilică sau ambele, apar două feluri de dizaharide: *reducătoare* (tip maltoză) şi *nereducătoare* (tip trehaloză).

Conform nomenclaturii biochimice (1963), dizaharidele nereducătoare se denumesc *glicozil-glicozide*, de exemplu, zaharoza: β-D-fructofuranozil, α-D-glucopiranozid sau α-D-glucopiranozil-β-D-fructofuranozid, iar cele reducătoare *glicozil-glucoză*(ozăl), de exemplu, lactoza: 4-0-β-D-galactopiranozil-α-D-glucopiranoza sau 0-β-D-galactopiranozil-(1→4)-α-D-glucopiranoză, dar, în practică se folosesc şi denumirile uzuale, mai simple.

Ca reprezentanţi ai dizaharidelor reducătoare citäm trehaloza şi zaharoza *(figura 1.15)*.

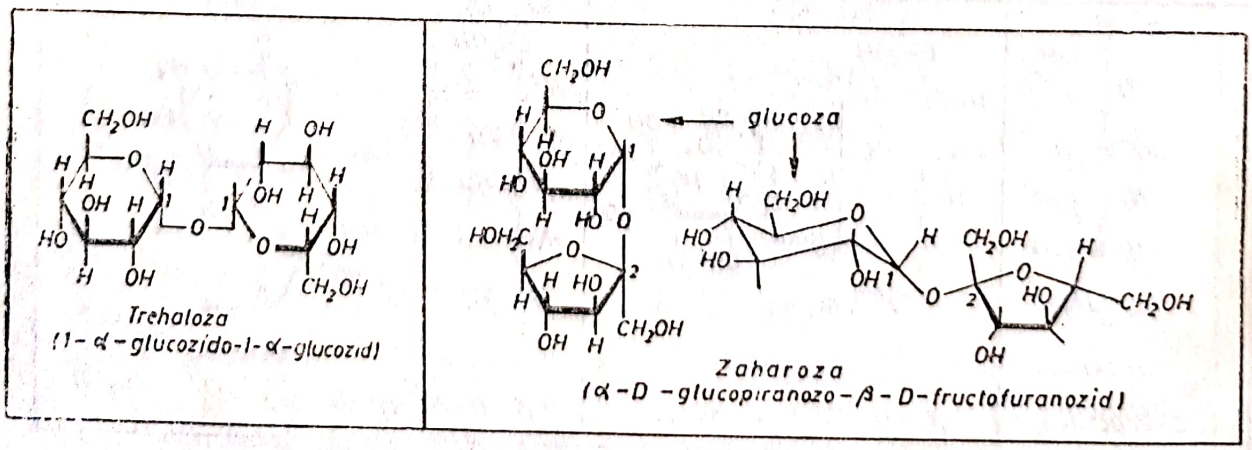


Fig. 1.15. Dizaharide nereducătoare

Trehaloza este formată din două molecule de α-glucoză legate prin grupările lor reducătoare (C_1 și C_1'). Se găsește, în cantitate destul de mare în ciuperci, fiind inițial obținută din cornul de secară, de unde denumirea mai veche de *micoză* și apoi „redescoperită" de Berthelot care îi dă și denumirea de trehaloză; apare și în drojdia de brutărie (20 g/kg), în alge, insecte, bacilul tuberculozei etc. Pe lîngă trehaloza obișnuită, cu legătură α—α'. se cunosc și formele de *izotrehaloză*, cu legătură β—β', și neotrehaloza (α—β').

Zaharoza se găsește în regnul vegetal, de exemplu în sfeclă și trestie de zahăr, din care se obține *zahărul comercial*, care este o zaharoză destul de pură. Are rotația specifică $[\alpha]_D^{20} = +66{,}5°$ și prin hidroliză (acidă, enzimatică) dă D-glucoza și D-fructoza; ultima avînd un caracter puternic levogir face ca amestecul obținut să fie levogir, cu $[\alpha]_D^{20} = -20°$. Această transformare de la zaharoza inițială dextrogiră la produsul hidrolizei, denumit și „zahăr invertit" este denumită *invertirea zaharozei*. O asemenea transformare are loc și în intestin sub acțiunea α-glucozidazelor, dar este hidrolizată și de β-fructozidaze.

F.R.IX prevede sub denumirea *Saccharum* (zaharoză) produsul cristalin incolor sau pulbere albă cristalină, fără miros, cu gust dulce și p.t. 160°; la temperaturi mai ridicate se caramelizează, răspîndind un miros caracteristic. Solubilitatea este de 1 p. în 0,5 p apă (cu reacție neutră), în 250 p. alcool și este greu solubilă în glicerină și practic insolubilă în eter și cloroform. Ca reacții de identificare se prevăd: reacția Fehling (după hidroliză); reacția cu azotat de cobalt în mediu de NaOH, cînd zaharoza dă o culoare violetă (spre deosebire de glucoză și lactoză).

Izozaharoza este o β-glucopiranozo—α-fructofuranoză.

Dizaharidele reducătoare mai importante sînt *maltoza, lactoza* și *celobioza*, la care se adaugă unele de interes redus pentru om, ca de exemplu, gentiobioza, melibioza, turanoza, primeveroza, vicianoza, rutinoza (prezente în unele specii vegetale).

Maltoza (figura 1.16) prezintă o legătură α-glicozidică (1 → 4) între 2 molecule de glucoză. Deși nu este răspîndită ca atare, prezintă importanță biologică fiind o etapă intermediară în hidroliza amidonului (din care se și prepară). Așa cum se vede din formulă, se cunoaște și o maltoză de formă β.

Celobioza (figura 1.16) are în structurarea celulozei același rol pe care îl are maltoza în amidon; apare ca intermediar în hidroliza enzimatică (celulaze) a celulozei. Avînd legătura dintre cele două molecule de glucoză de tip β-glucozid-4-glucoză este desfăcută de β-zaharidaze (celobiaze). Se obține prin hidroliza celulozei cu anhidridă acetică-acid sulfuric, sub formă de octoacetat, din care se eliberează prin saponificare.

Lactoza (figura 1.16) este β-galactozido (1 → 4) glucoza, cunoscîndu-se și forma β-galactopiranozo-β-glucopiranoza.

F.R.IX prevede *Saccharum lactis* (lactosum, lactoză) ca o pulbere cristalină albă, fără miros, cu gust slab dulceag; prin calcinare produce un miros de zahăr ars. Este solubilă, 1 p. în 6 p. apă și practic insolubilă în alcool, eter, cloroform. Are $(\alpha)_D^{20} = +52°$ pînă la $+53°$ (c = 10 în apă cu 1 ml amoniac diluat).

Lactoza prezintă mare importanță biologică fiind glucida caracteristică laptelui (50 g/l în laptele de vacă și 65 g/l în cel de femeie) și care asigură o mare parte din necesitățile energetice și plastice ale sugarului. În laptele de femeie se găsesc încă aproximativ 8 oligozaharide (Kuhn) care derivă din lactoză. Lactoza este hidrolizată enzimatic de β-galactozidază numită și *lactază*.

Scanned with OKEN Scanner

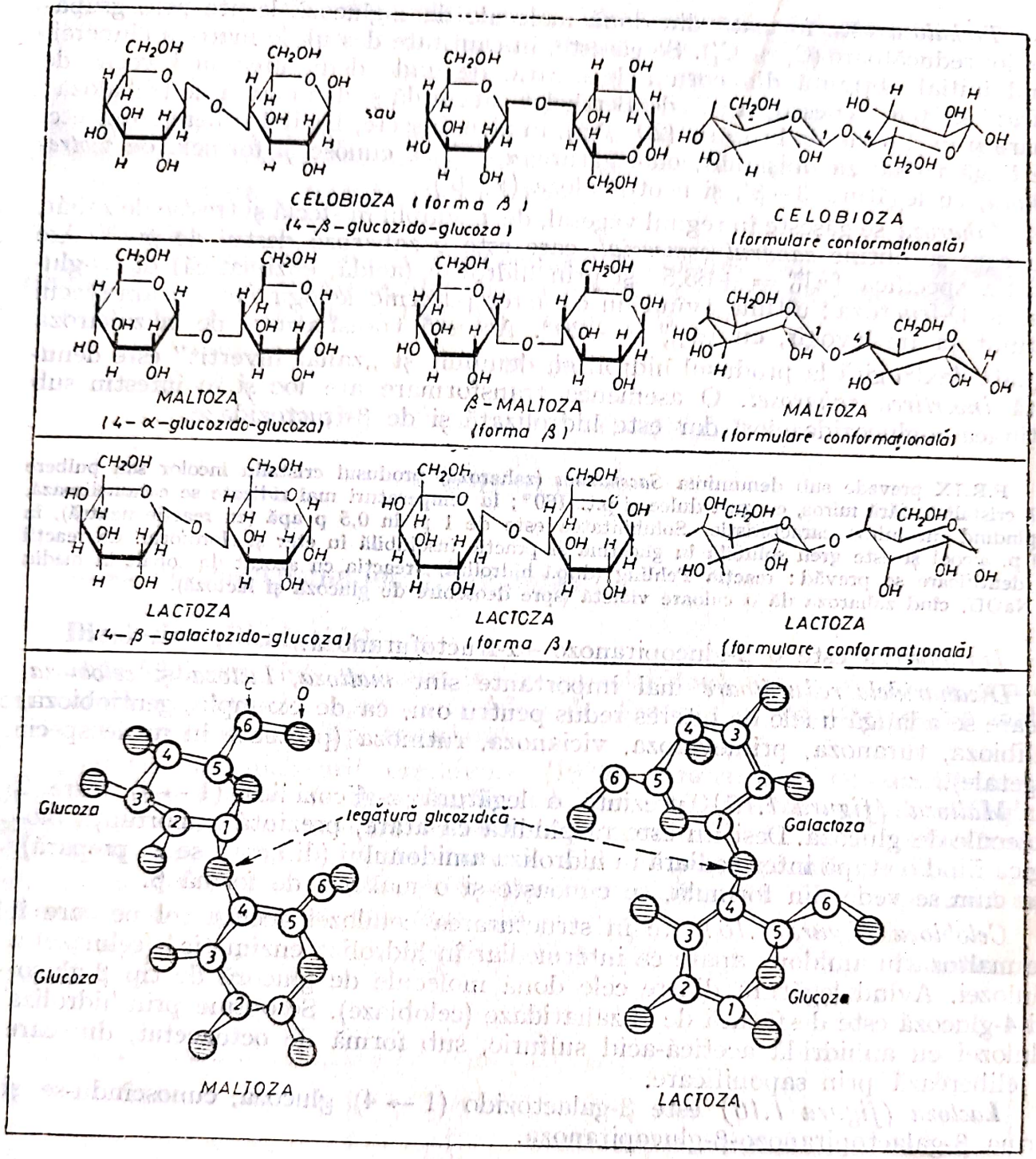


Fig. 1.16. Formule și reprezentări pentru dizaharidele reducătoare

Gentiobioza este o β-glucozido-6-glucoză, care intră în structura gentianozei (trizaharid), în amigdalozid („amigdalina" din sîmburii de migdale), crocină (colorantul șofranului a cărui aglicon este o carotină).

Turanoza, dizaharid reducător izomer al zaharozei cu legătură β (nu este hidrolizat de „emulsină"), intră în structura melezitozei (trizaharid).

Melibioza deși este hidrolizată de β-glucozidaze („emulsina") este considerată ca o α-galactozido-6-glucoză. Intră în structura rafinozei (trizaharid).

Scanned with OKEN Scanner

Primeveroza este o xilido-glucoză reducătoare obținută prin hidroliza menajată a unor heterozide din *Primula officinalis.*

Vicianoza, arabino-glucoză, obținută prin hidroliza vicianozidului din *Vicia augustifolia* (alături de HCN și aldehida benzoică).

Rutinoza, o 6-β-rhamnozido-glucoză apare între produșii de hidroliză izolați din *Ruta graveolensis;* alături de flavonoide intră în stuctura vitaminei P (2.1.18).

Oligozaharide cu 3—5 molecule de oze

Denumirea acestor oligozaharide se face începînd cu prima oză, nereducătoare, și continuînd cu celelalte și notînd, în paranteză, cele două cifre care indică legătura dintre oze, de exemplu, *rafinoza:* 0-α-D-galactopiranozil-(1 → 6)--α-D-glucopiranozil-β-D-fructofuranozid și *gentianoza:* 0-β-D-glucopiranozil--(1 → 6)-α-D-glucopiranozil-β-D-fructofuranozid *(figura 1.17).*

Triholozide (trizaharide) naturale:

Gențianoza, triholozid nereducător extras din rădăcina de gențiana dă, sub acțiunea invertazei, gențiobioza și β-fructoză, și cu emulsina, zaharoză + glucoză.

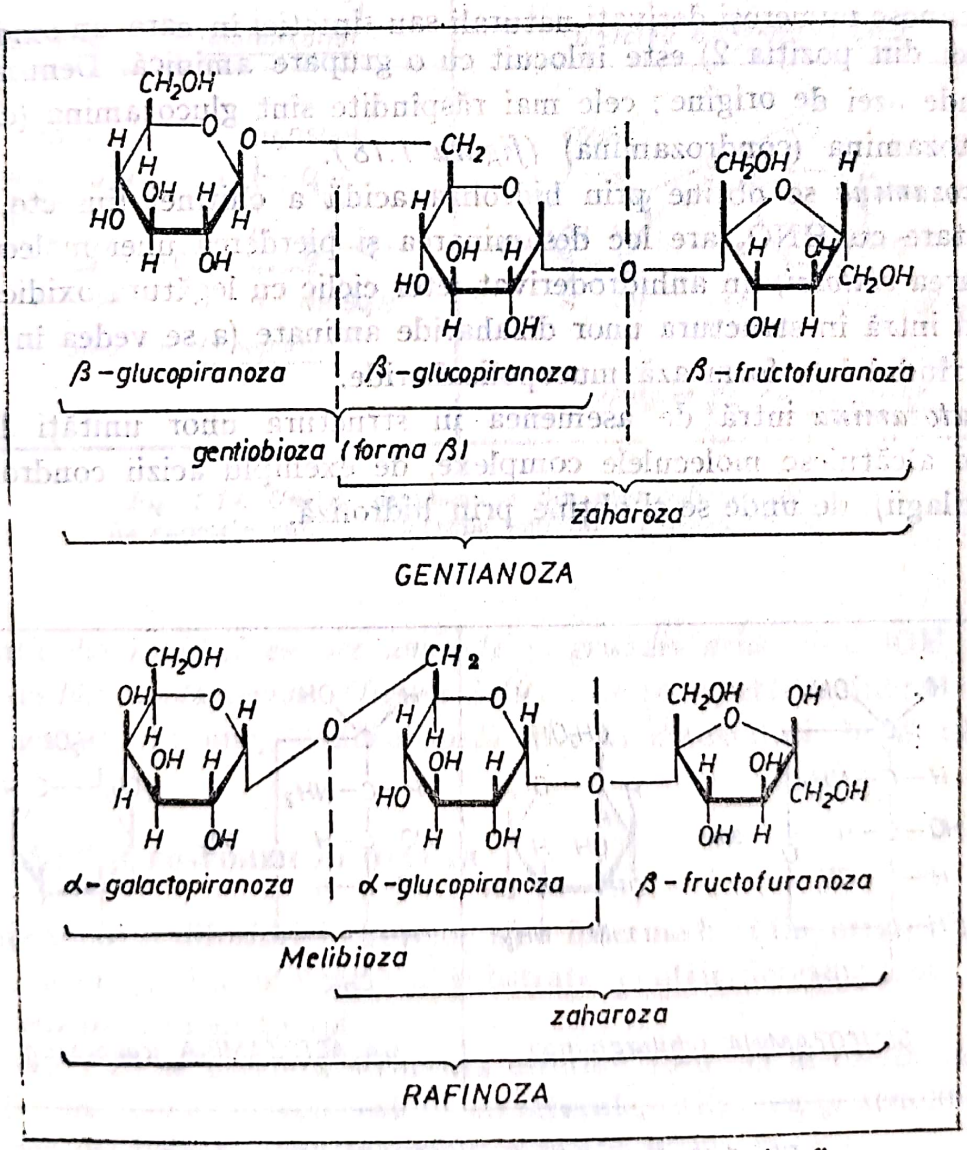


Fig. 1.17. Formulele unor trizaharide: gentianoza și rafinoza

Rafinoza însoţeşte zaharoza în sfecla de zahăr şi după tipul de hidroliză se desface în fructoză + melibioză (drojdie) sau zaharoză + galactoză (emulsina).

Melizitoza este un trizaharid nereducător care prin hidroliză menajată conduce la glucoză + turanoză. Poate fi considerată ca o zaharoză substituită cu un rest glicozil la C_3 al fructozei, fără a se cunoaşte exact dacă una din legături este α sau β, de aceea i se atribuie structura : 3-(α-D-glucopiranozido)- ? -D-fructofuranozido-α-D-glucopiranoză.

Dintre *tetraholozide* (tetrazaharide) se poate menţiona *stachioza*, din *Stachis tuberifera*, alcătuită din 2 mol. D-galactoză, 1 mol. D-glucoză şi 1 mol. D-fructoză.

Ca *pentaholozidă* menţionăm *verbascoza*, o galactozido-stachioză izolată din rădăcina de *Verbascum thapsus*.

1.1.4.3. OZE ŞI OZIDE AMINATE

Se cunosc numeroşi derivaţi naturali sau sintetici în care un oxidril al ozelor (de obicei din poziţia 2) este înlocuit cu o grupare aminică. Denumirea uzuală corespunde ozei de origine ; cele mai răspîndite sînt glucozamina (chitozamina) şi galactozamina (condrozamina) *(figura 1.18)*.

Glucozamina se obţine prin hidroliza acidă a chitinei (insecte, crustacee). Prin tratare cu HNO_3 are loc desaminarea şi pierderea unei molecule de apă, cu formarea *chitozei*, un anhidroderivat (eter ciclic cu legătură oxidică 2,5). Glucozamina intră în structura unor dizaharide aminate (a se vedea în continuare) care, la rîndul lor, formează mucopolizaharide.

Galactozamina intră de asemenea în structura unor unităţi dizaharidice, care apoi alcătuiesc moleculele complexe, de exemplu acizii condroitinsulfurici (din cartilagii), de unde se şi obţine prin hidroliză.

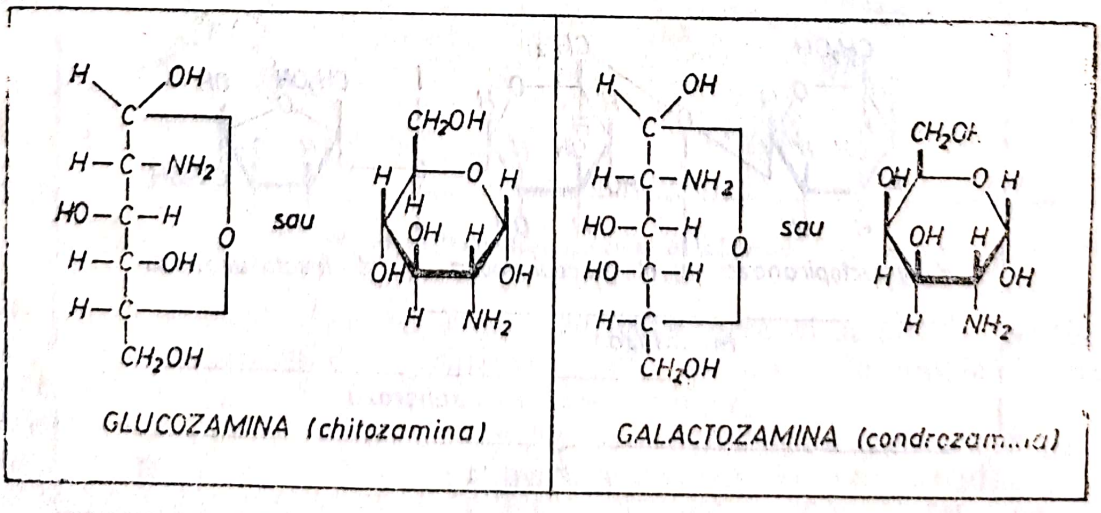


Fig. 1.18. Formulele glucozaminei şi galactozaminei

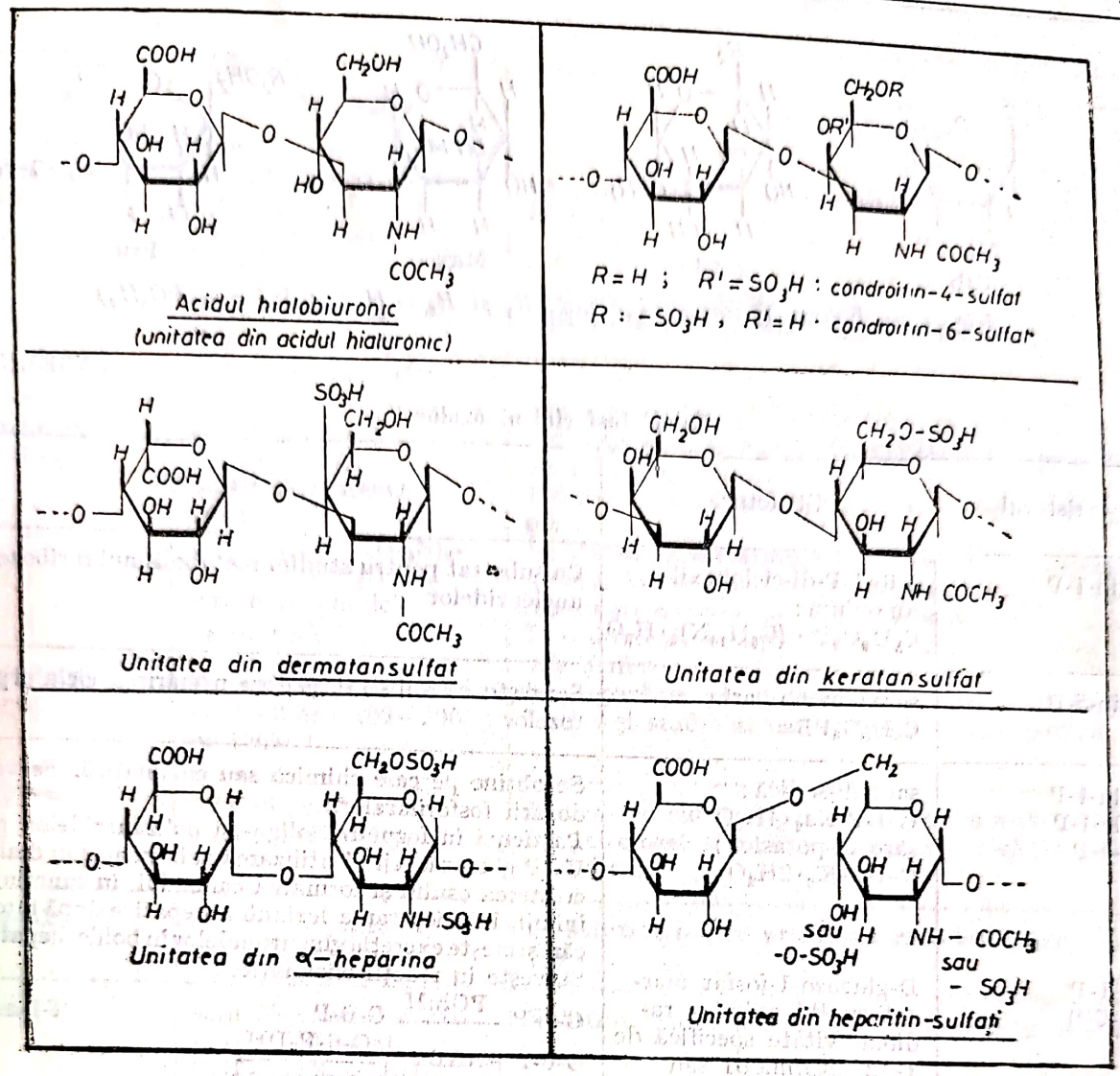


Fig. 1.19. Unități dizaharidice din mucopolizaharide
(la capetele moleculei locurile punctate se leagă cu H)

Derivații dizaharidici cu oze aminate și grupări acide (—COOH; $-SO_3H$) constituie *unități fundamentale (figura 1.19)* care se repetă în diferite mucopolizaharide: acid hialuronic, condroitinsulfați, keratansulfați, heparină etc.

1.1.4.4. ESTERII FOSFORICI AI OZELOR

Esterii mono- și difosforici ai ozelor sînt intermediari importanți în metabolismul glucidelor și sînt utilizați ca substrate pentru determinarea activității diferitelor enzime sau în terapie.

În *figura 1.20* se prezintă structura esterilor fosforici ai ozelor mai importanți, iar în *tabelul 1.8*, caracteristicile structurale, utilizarea și semnificația biologică a unor produse comerciale (unele marcate ^{14}C).

Scanned with OKEN Scanner

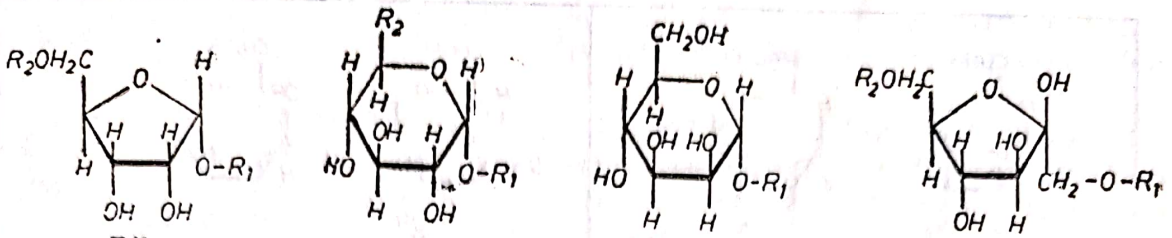


Fig. 1.20. Esterii fosforici ai ozelor. R_1 și $R_2 = H$ sau $P\ (= -PO_3H_2)$

TABELUL 1.8

Esteri fosforici ai ozelor

Esterul	Structura	Observații. Utilizări
Rib-1-P	Rib-1-P-di-ciclohexil amonium: $C_5H_9O_8P \cdot (C_6H_{14}N)_2 \cdot H_2O$	Ca substrat pentru studiul metabolismului ribozei și nucleozidelor
Rib-5-P	sarea mono-bariu $C_5H_9O_8PBa$	Servește ca substrat pentru urmărirea ciclului pentozelor
Glu-1-P Glc-1-P G-1-P	sare di-sodică: G-1-P-$Na_2 \cdot 4H_2O$ sare di-potasică: G-1-P-$K_2 \cdot 2H_2O$	Se obține pe cale chimică sau enzimatică. Servește dozării fosforilazelor. Participă în formarea oligo- și polizaharidelor prin UDP-glucoză. Ajută utilizarea zaharurilor în diabet, creșterea osului și formarea calusului, în funcțiunea inimii, în micșorarea leziunilor hepatice după intoxicări și crește excreția glucuronidelor în bolile hepatice. Servește în reacții enzimatice: G-1-P $\xrightarrow{\text{PGluM}}$ G-6-P G-6-P+NADP$^+$ $\xrightarrow{\text{G-6-P-DH}}$ Gluconat-6-P+NADPH+H$^+$
G-1-P (u-C^{14})	D-glucozo-1-fosfat marcat cu ^{14}C având o radioactivitate specifică de 1—2 mCi/mMol sau 10—20 mCi/mMol	
Glu-6-P Glc-6-P G—6—P	sare di-sodică: G-6-P-Na_2 sare mono-bariu: G-6-P-Ba$\cdot 7H_2O$	Servește pentru dozarea G-6-P-DH și ca substrat pentru fosfatazele G-6-P specifice și ca punct de plecare pentru prepararea altor fosfați ai ozelor. Implicat în sinteza steroizilor împreună cu NADP, în normalizarea G-6-P hepatic la diabetici, în osificare la rahitici și protejarea hemoglobinei în favism Servește în dozări enzimatice de ex. G-6-P+NADP$^+$ $\xrightarrow{\text{G-6-PDH}}$ Gluconat-6-P+NADPH+H$^+$
D-Glu-6-P (u—C^{14})	Produs marcat cu o radioactivitate specifică de 1—2 mCi/mMol sau 100—200 mCi/mMol	
Glu-1,6-P_2 G-1,6-P_2	sare teraciclohexil-amonium: $C_6H_{10}O_{12}P_2 \cdot (C_6N_{16}N)_4 \cdot H_2O$	Servește determinării activității fosfoglucomutazei. P din poziția 1 se hidrolizează ușor cu acizi, cel din poziția 6 greu.
Fru-1-P F-1-P	sare disodică: $C_6H_{11}O_9PNa_2$ sare di-ciclohexil-amoniu: $C_6H_{11}O_9P-(C_6H_{14}N)_2$	Utilizat în determinarea activității F-1-P-aldolazei

TABELUL 1.8 (continuare)

Esterul	Structura	Observaţii. Utilizări
D-Fru-6-P F-6-P	sare disodică: $C_6H_{11}O_9PNa_2$ sarea mono-bariu: $C_6H_{11}O_9PBa_2$	Serveşte pentru dozarea activităţii fosfoglucoizomerazei: F-6-P $\overset{PGI}{\rightleftharpoons}$ G-6-P şi a F-6-fosfokinazei
D-F-6-P (u-C^{14})	Radioactivitatea specifică de 1—2 mCi sau 200—300 mCi/mMol	Utilizat în studiul metabolismului fructozei
Fru-1,6-P_2 F-1-6-P_2	sare trisodică: $C_6H_{11}O_{12}P_2Na_3$ sare tetra-ciclohexil-amonium: $C_6H_{10}O_{12}P_2 \cdot (C_6H_{14}N)_4 \cdot 10H_2O$ sare di-magnezică: $C_6H_{10}O_{12}P_2Mg_2$	Serveşte dozării activităţii aldolazei şi preparării altor hexoze şi trioze fosforilate. P din poziţia 1 se hidrolizează uşor cu acizi, cel din 6, greu. Se utilizează în tratamentul oboselii, în şocurile traumatice, în creatinuria din poliomielite şi distrofii musculare şi creşte toleranţa la glucide a diabeticilor. În combinaţie cu alţi compuşi inhibă cariile şi eroziunile dentare.
D-F-1,6-P_2 (u-C^{14})	Radioactivitatea specifică de 1—2 sau 100—200 mCi/mMol	Se prepară pe cale enzimatică, serveşte dozării aldolazelor şi studiului metabolismului intermediar
Gal-1-P	sare di-potasică: $C_6H_{11}O_9PK_2 \cdot 5H_2O$	Utilizat ca substrat pentru cercetarea metabolismului galactozei şi pentru activitatea Gal-1-P-uridil-transferazei
Gal-6-P	sare mono-bariu: $C_6H_{11}O_9PBa$	Ca substrat pentru urmărirea metabolismului galactozei
Man-1-P	sare di-potasică a manozo-1-fosfatului: $C_6H_{11}O_9PK_2 \cdot 4H_2O$	Substrat pentru urmărirea metabolismului manozei
Gluconat-6-P	sare trisodică: $C_6H_{10}O_{10}PNa_3 \cdot 2H_2O$	Serveşte pentru dozarea activităţii 6-fosfo-gluconat-dehidrogenazei Gluconat-6-P + $NADP^+$ $\xrightarrow{6\text{-PGDH}}$ Ribulozo-5-P + CO_2 + NADPH + H^+ şi pentru prepararea ribulozo-5-fosfatului.
Gluconat-6-P (u-C^{14})	Radioactivitatea specifică de 1—2 sau 1000—200 mCi/mMol	Serveşte dozării 6-PGDH şi urmăririi metabolismului 6-P-gluconatului

1.1.4.5. POLIOZIDE (POLIZAHARIDE)

Amidonul

Amidonul constituie rezerva glucidică a seminţelor (în special a cerealelor) şi a tuberculilor.

F.R.IX în monografia *Amylum* (amidon) prevede amidonul provenit din diferite specii, indicînd necesitatea de a arăta natura amidonului respectiv.

Scanned with OKEN Scanner

Amylum tritici (de grîu) obţinut din cariopsele de *Triticum vulgare Vill* (Graminaceae) se prezintă sub forma unor granule mici (Ø : 2—9 μm) şi mai mari (Ø : 15—45 μm), ovale sau rotunde, cu straturi concentrice puţin vizibile şi o falie longitudinală.

Amylum maydis (de porumb) din cariopsele de *Zea mays L.* (Graminaceae) apare ca granule mici, rar poliedrice sau rotunde, mici (Ø : 3—8 μm), altele poliedrice sau ovoidale mari (Ø : 10—20 şi chiar 30 μm); stratificarea se observă mai rar, dar apare de obicei un hil central, cu 3—4 falii radiale.

Amylum solani (de cartof) se obţine din tuberculii de *Solanum tuberosum L.* (Solanaceae) şi se prezintă sub formă de granule neregulate, ovoidale mari (Ø : 10—70 şi chiar 100 μm), cu un hil excentric şi stratificare vizibilă.

În afară de acestea se mai poate menţiona şi amidonul de *orez, amylum orizeae,* cu granule foarte fine.

Granulele de amidon sînt alcătuite din două părţi : *amiloza,* care predomină în interior, şi *amilopectina,* la exterior (ca un fel de înveliş). Datorită acestei neomogenităţi, ele prezintă la microscopul polarizant „crucea de polarizare", care se observă mai uşor la granulele de amidon de cartof, deoarece acestea sînt mai mari. Separarea celor două componente se poate realiza prin trecerea pe coloana de vată hidrofilă, care reţine amiloza, sau, mai bine, pe baza proprietăţilor de dizolvare în diferiţi alcooli (butanol, ciclohexanol, alcool amilic).

Structura amilozei şi amilopectinei este dată în *fig. 1.21.*

Amiloza sau *n-amiloza,* cu gr. mol. de aproximativ 50 000, are o catenă liniară formată din circa 300 mol. de α-glucoză legate 1 → 4 ; prin hidroliză enzimatică (amilaze) dă unităţi de maltoză, iar prin hidroliză acidă, dă α-glucoză. În laborator, prin incubarea G-1-P cu fosforilaze vegetale, s-a obţinut un produs similar amilozei, dar alcătuit din numai 80—160 mol. α-glucoză. Amiloza este solubilă în apă fierbinte formînd o soluţie coloidală, care la rece dă o cocă (gel). Se recunoaşte prin coloraţia albastră pe care o dă cu iodul. Natura acestei coloraţii a fost mult discutată ; în prezent se crede că molecula amilozei (formată dintr-o spirală de 100-150 unităţi glucoză) ar concentra, la interiorul canalului format de spirală, iodul, coloraţia albastră datorindu-se absorbţiei luminii, trecînd mai departe numai razele albastre.

Amilopectina sau *izoamiloza,* cu gr.mol. de 200.000 — 300.000, dă o coloraţie violacee cu iodul. Are o structură mult mai complicată decît n-amiloza, pe lîngă lanţurile de α-glucoză legate 1 → 4 prezentînd şi ramificaţii prin legături 1 → 6, cu un grad de ramificare de o ramificaţie pentru 8—10 unităţi de glucoză. Dovada existenţei ramificaţiilor s-a făcut atît prin identificarea izomaltozei (6-α-glicozil-glucoza) între produşii de scindare, cît şi prin hidroliza amidonului de orez, în prealabil *metilat,* cînd se obţine : trimetilglucoză (88%), tetrametilglucoză (3,3%) şi dimetilglucoză (3,4%). Considerînd că metilarea, în condiţiile experienţei efectuate, se face la nivelul grupărilor OH libere, prezenţa dimetilglucozei arată existenţa unor molecule de glucoză legate în lanţul principal prin OH de la C_1 şi C_4 şi în ramificaţii prin C_6 *(fig. 1.22).*

Hidroliza amidonului. Sub acţiunea enzimelor (amilaze) sau a acizilor, amidonul se degradează într-o serie de produşi intermediari denumiţi *dextrine,* cu molecule din ce în ce mai mici şi care se clasifică după coloraţia pe care o dau cu iodul : *amilodextrine* (culoare albastră), *eritrodextrine* (roşie), *acrodextrine* (nu se colorează cu iodul) pentru a ajunge, în final, la glucoză, în hidroliza acidă, şi la maltoză, în hidroliza cu amilaze, aceasta desfăcîndu-se la rîndul ei tot în glucoză sub efectul altor enzime (maltaze).

Heterogenitatea amidonului. Faptul că prin arderea amidonului se obţine o cenuşă care conţine anioni fosfat şi silicat şi o serie de cationi : Ca^{2+}, Mg^{2+}, Na^{+},

Scanned with OKEN Scanner

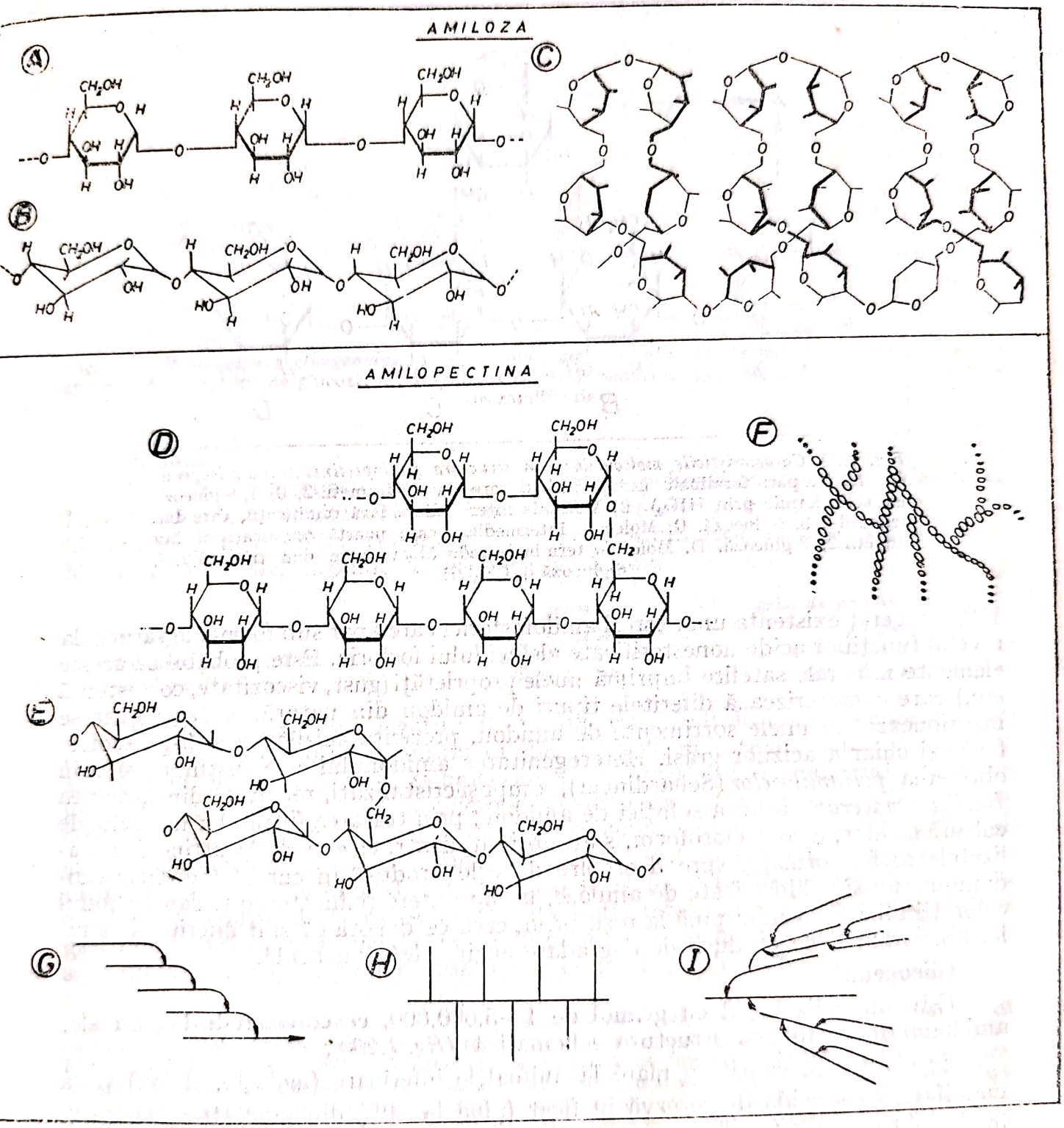


Fig. 1.21. Reprezentări pentru amiloză și amilopectină. A. Succesiunea moleculelor de glucoză, B. reprezentarea conformațională și C. înfășurarea moleculelor de glucoză în *amiloză*. Modele pentru amilopectină: D. succesiunea moleculelor de glucoză, E. reprezentarea conformațională, F. reprezentarea diagramatică, G. formularea lamelară *(Haworth)*, H. reprezentarea „în pieptene" *(Staudinger)*, I. formula arborescentă *(H. C. Meyer)*.

Scanned with OKEN Scanner

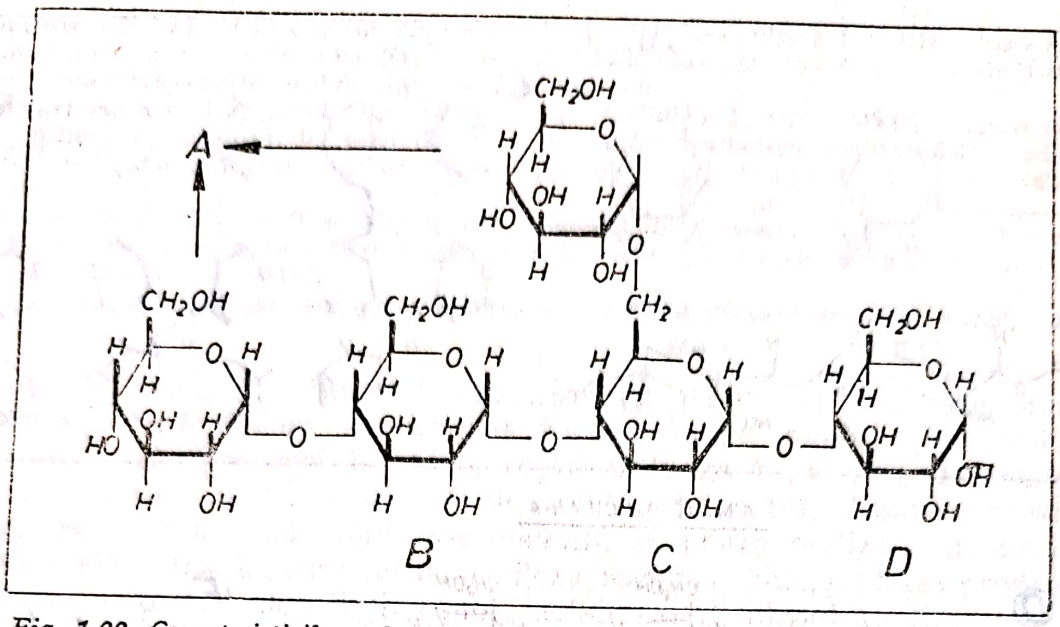


Fig. 1.22. Caracteristicile moleculelor din structura amilopectinei sau a glicogenului. A. Grupări terminale nereducătoare care dau tetrametil-2, 3, 4, 6-glucoză (și acid formic prin HIO_4). B. Molecule intermediare fără ramificații, care dau trimetil-2, 3, 6-glucoză. C. Molecule intermediare care poartă ramificații și dau dimetil-2, 3-glucoză. D. Molecule terminale reducătoare care dau trimetil 2, 3, 6-glucoză + CH_3OH

K^+, a sugerat existența unor esteri amilofosforici care apar sub formă de săruri, la nivelul funcțiilor acide nonesterificate ale acidului fosforic. Este probabil că aceste elemente minerale satelite imprimă unele proprietăți (gust, vîscozitate, consistență etc.) care caracterizează diferitele tipuri de amidon din natură. De asemenea se menționează, în unele sortimente de amidon, prezența acizilor α și β-glicerofosforici și chiar a acizilor grași. Heterogenitatea amidonului este susținută și prin obținerea *poliamilozelor* (Schardinger), compuși cristalizați, rezultați din acțiunea *Bacillus macerans* asupra soluției de amidon; prin tratarea filtratelor mediului de cultură cu eter, alcool, cloroform, s-au obținut dextrine α și β. Dextrinele cristalizabile, astfel formate, spre deosebire de cele produse în cursul hidrolizei amidonului, nu sînt hidrolizate de amilaze, nu au putere reducătoare și dau cu iodul colorații albastre-verzui pînă la roșu-brun, ceea ce denotă că sînt diferite de amiloza naturală și de produșii de degradare enzimatică sau acidă.

Glicogenul

Este un polizaharid cu gr.mol de 1—5.000.000, ce corespunde la animale, amidonului vegetal, cu structura schematică *(fig. 1.23)*:

Se găsește în cantitate mare la animalele inferioare (moluște, stridii) și la mamifere, ca glucidă de rezervă în ficat (pînă la 10% din greutatea ficatului), în mușchi (unde asigură procesul contracției), precum și în bacterii și chiar la unele plante (ciuperci). Poate fi obținut din ficat prin macerare apoasă și precipitare cu alcool. Ca structură se aseamănă cu amilopectina, fiind hidrolizat de amilaze, dar are ramificații mai dese: o ramificație la 3—4 unități glucoză; lungimea ramificațiilor este de 6—12 unități glucoză. Cu iodul dă o coloratie roșie-cărămizie.

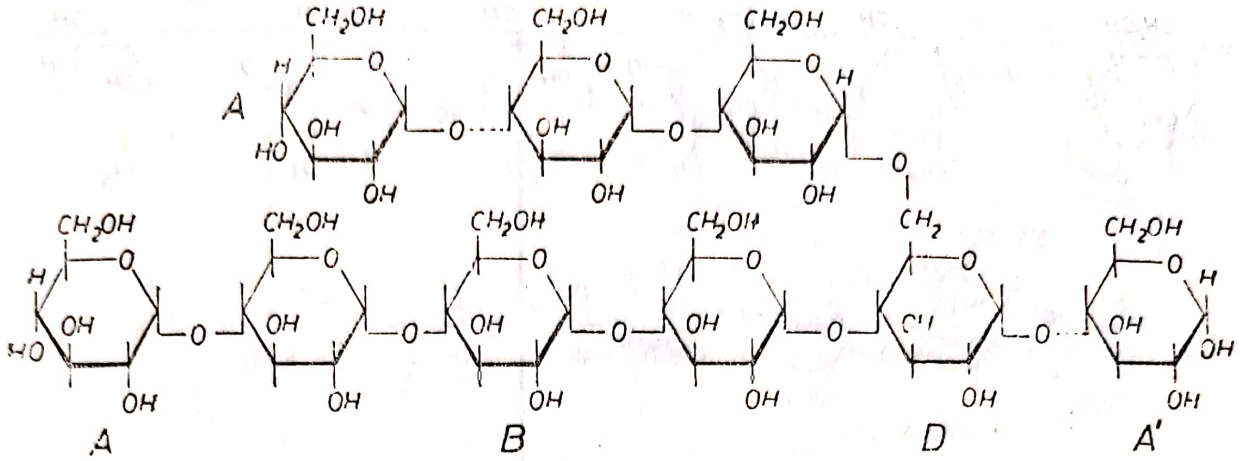


Fig. 1.23. Reprezentarea glicogenului. A şi A': molecule de glucoză terminale, B: fragmente de aproximativ 3 resturi de glucoză, C: fragmente de 6—7 resturi de glucoză, D: molecule de glucoză de ramificaţie

Celuloza

Molecula celulozei este alcătuită din lanţuri poliozidice ce cuprind de obicei 1.000 unităţi β-glucopiranozice *(figura 1.24)*, constituite în unităţi de celobioză (dizaharid); nu cuprinde ramificaţii, dar are posibilitatea de a se uni în fibre. Mărimea moleculei depinde de originea produsului:

	gr. mol.:	*grad de polimerizare:*
Celuloza nativă	>570.000	>3.500
Celuloza purificată (vată)	150.000—550.000	1.000—3.000
Celuloza din lemn	90.000—150.000	600—1.000

Datorită tipului de legături β, ea nu este hidrolizată de amilaze ci de *celulaze*, absente din organismul uman, dar prezente în sistemul hepatopancreatic al melcului, în unele ciuperci şi mucegaiuri *(Aspergillus)*. În rumenul ierbivorelor se găseşte o bogată floră de microorganisme care pot metaboliza celuloza, cu formarea de acizi graşi inferiori (în special propionic, butiric), gaze (CO_2, CH_4, H_2) şi urme de glucoză. Acizii graşi inferiori formaţi sînt folosiţi chiar de microorganisme, dar şi de către animal, servind ca o sursă importantă de energie. La om, celuloza este puţin utilizată, sub influenţa florei intestinale, şi trece prin tractul gastrointestinal în mare măsură nemodificată, eliminîndu-se prin fecale, de aceea se utilizează la sugari pentru stimularea peristaltismului intestinal.

F.R.IX prevede *vata hidrofilă BC, Gossypium depuratum mixtum*, alcătuită din perii unor specii de *Gossypium* (Malvaceae), separaţi de impurităţi, degresaţi, cordaţi şi albiţi, în amestec cu celofibra hidrofilă (maximum 57%). Macroscopic se prezintă ca fire lungi alcătuite din peri şi fibre, formînd fîşii sau mase albe uşoare, fără miros şi fără gust; microscopic, se observă peri tectori lungi, unicelulari (cu grosimea de 140 μm), în formă de panglici, acoperiţi cu o cuticulă, cu lumenul destul de redus şi fibre liniare (cu lungimea peste 16 mm). Se dizolvă în lichidul *Schweitzer* şi, cu cloro-iodura de Zn, dă coloraţie violetă.

Dextranii

Prin însămînţarea soluţiei de zaharoză cu *Leuconostoc dextranicum* sau *L. mesenteroides*, după cîteva zile de fermentaţie, la adăugarea alcoolului precipită un polizaharid brut, care, purificat, conduce la *dextran*, cu molecula formată din aproximativ 550 unităţi de glucoză, legate α între 1—6'.

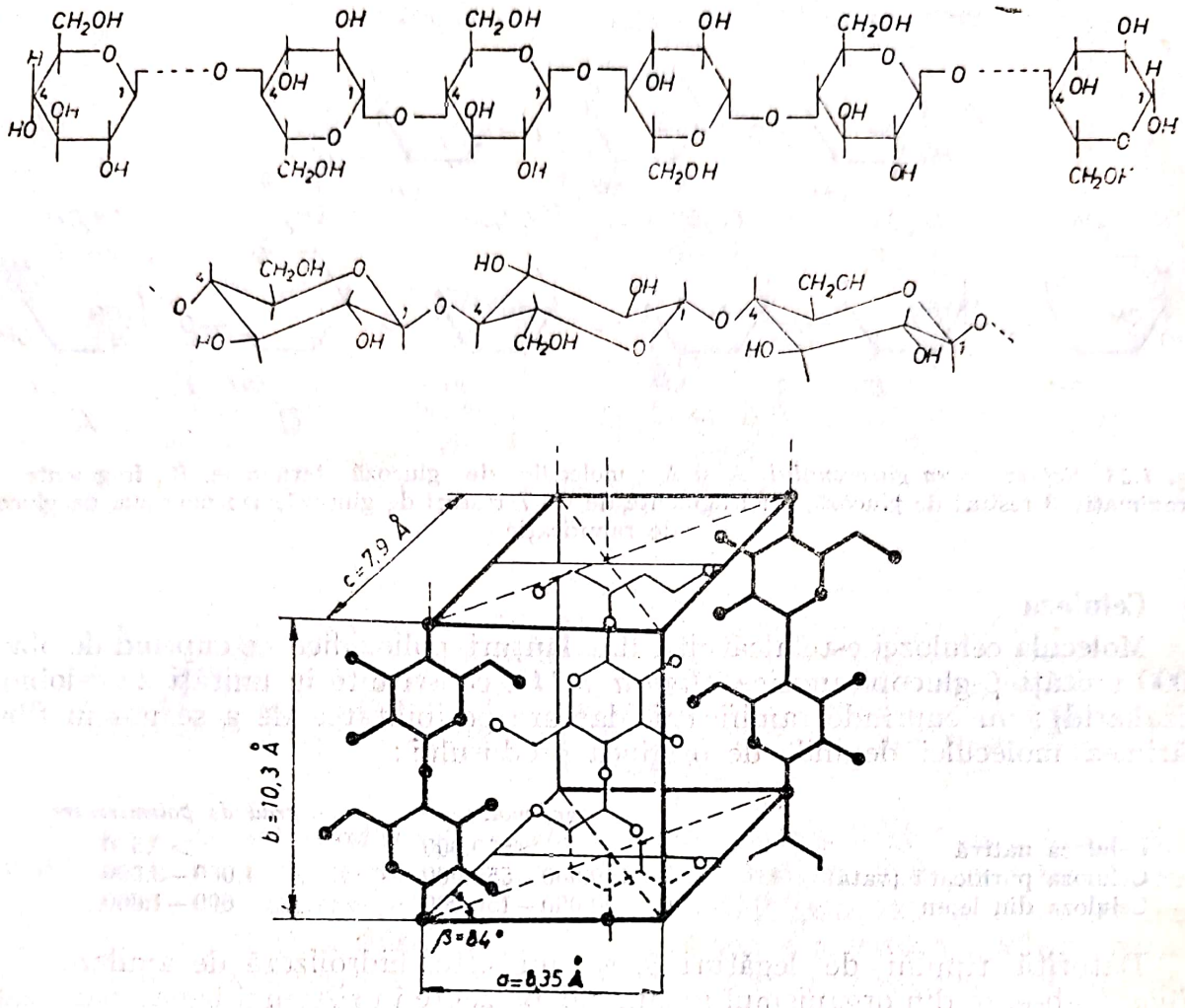


Fig. 1.24. Formulele celulozei şi reprezentarea spaţială a „celulei elementare" a celulozei (după C. D. Neniţescu, 1980)

În scop farmaceutic (F.R.IX) se utilizează *Dextran 40* şi *Dextran 70* (cu gr.mol. medie ponderală de 40.000±10.000 şi respectiv 70.000±10.000) polimeri ai D-glucopiranozei cu aproximativ 95% legături 1—6-α-glicozidice în catena principală şi în cele laterale. Catenele laterale, legate de cea principală prin legături 1—3-glicozidice, se găsesc în proporţie de 1 : 5, în majoritate mai mari decît un rest de D-glucopiranoză. Se utilizează ca succedaneu al plasmei sanguine.

Laminarina (laminarane) este un polizaharid extras din algele brune. La fel cu dextranii este integral format din D-glucoză. Prin hidroliză menajată dă *laminaribioza*, care ar fi unitatea dizaharidică de bază, cu legături 1—3′ între moleculele de glucopiranoză.

Mananele sînt polizaharide formate din aproximativ 80 unităţi de β-D-manopiranoză. Însoţesc celuloza şi alte polizaharide din constituţia pereţilor celulari vegetali. O manană izolată din drojdia de brutărie a fost mai mult studiată şi i s-a atribuit o structură ramificată. *Mannocaroloza* este o manană obţinută din culturile de *Penicilium Charlesi*, pe mediu de glucoză.

Galactanele sînt polizaharide formate din molecule de β-galactopiranoză, legate 1 → 4, ce apar în mai multe varietăţi : *galactocaroloza* (ce însoţeşte mannocaroloza), *galactogenul* (denumit prin analogie cu glicogenul), din melci (Helix pomatia) etc.

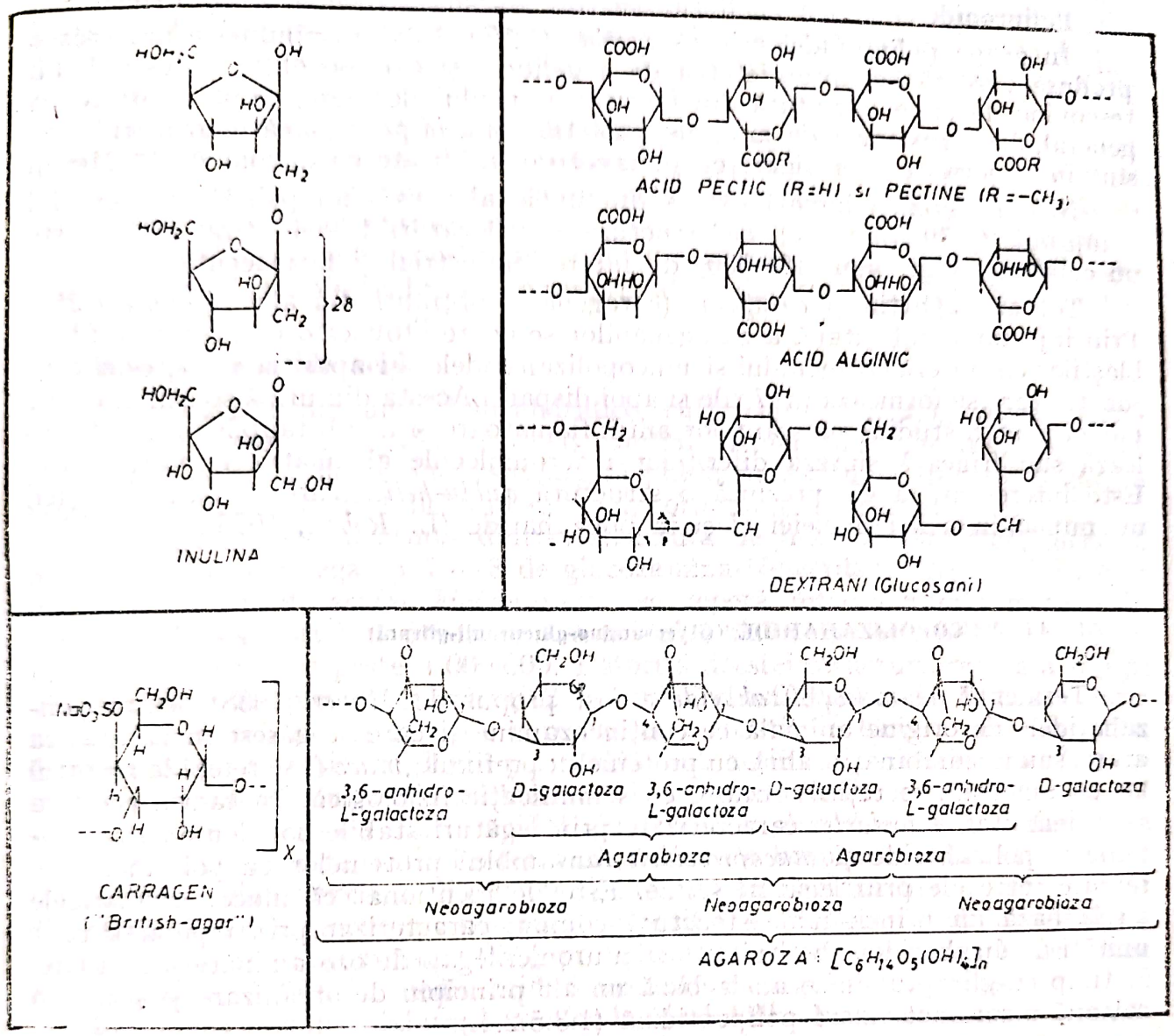


Fig. 1.25. Structura unor polizaharide : inulina, acid pectic şi pectine, acid alginic, dextrani, carragen, agaroză

Inulina face parte din polizaharidele denumite *fructozane*, fiind alcătuită din 9—22 unităţi de β-fructofuranoză legate prin C_2 *(figura 1.25)*. Pentru extragere serveşte rădăcina de cicoare (care conţine 15—20%) şi tuberculii de dalie.

Levanele sînt tot fructozane, dar cu moleculele de fructoză legate $2 \rightarrow 6'$, izolate din mediile de cultură a unor bacterii *(Aerobacter levanicum, Bacillus subtilis)*.

Pentozani

Arabanele se găsesc în pereţii celulelor vegetale în asociaţie cu esterii metilici ai acidului galacturonic, sub forma unor combinaţii care dau soluţii vîscoase, denumite *pectine*. Ele sînt formate din unităţi de L(+)-arabo-furanoză legate $1 \rightarrow 5$, iar esterii metilici ai acidului galacturonic prin legături $1 \rightarrow 4$.

Xilanele (xilani) se găsesc tot în pereţii celulelor vegetale (mai ales angiosperme), de unde se pot extrage în mediu alcalin. Sînt alcătuite din xilopiranoze legate $1 \rightarrow 4$ iar cele obţinute din ierbacee prezintă şi ramificaţii.

Poliuronide

În grupa poliuronidelor intră *pectinele (fig. 1.25)* răspîndite în numeroase produse vegetale, cu proprietatea de a gelifica, şi care se obţin industrial din tescovina de mere (rezultată din fabricarea sucului de mere). Sînt alcătuite, în general, din amestecuri de arabane, galactane şi *acid pectic*, a cărui grupări acide sînt în majoritate esterificate cu metanol sau salificate cu cationi (Ca^{2+}, Mg^{2+}).

Acidul alginic (alginat) extras din unele alge este un polimer al acidului manuronic (polimanuronic), cu structură β în legături 1 → 4′ *(fig. 1.25)*. Este un compus cu gr. mol. 186.000, de interes industrial şi farmaceutic.

Tot aici aparţin şi *caragenii* (caragenani) obţinuţi din alge *(figura 1.25)*. Prin injectarea subcutană a caragenanilor se poate provoca o proliferare a fibroblaştilor cu sinteza colagenului şi mucopolizaharidelor şi apariţia unui ţesut conjunctiv care se formează în 7 zile şi apoi dispare. Acesta din urmă se utilizează ca model pentru studiul substanţelor antiinflamatoare şi a substanţelor care stimulează sau frînează sinteza diferitelor macromolecule ale matricei intercelulare. Este interesant că ele prezintă o structură *„dublu-helix"*, care se găseşte astfel, nu numai în acizii nucleici ci şi în polizaharide (*L. Robert*, 1975).

1.1.4.6. MUCOPOLIZAHARIDE (Glycosamino-glucuronil-glicani)

Termenul de *mucopolizaharide* a fost propus de *Meyer* (1938) pentru polizaharidele de origine animală ce conţin ozamine şi care se găsesc în natură, ca atare, sau în combinaţii saline cu proteinele ; prefixul *„muco-"* se referă la raportul lor cu mucusul, secreţie vîscoasă, cu semnificaţie fiziologică. În cadrul acestora s-au delimitat *mucoidele*, caracterizate prin legături stabile covalente între proteine şi polizaharide şi *mucoproteidele*, ansamblul proteinelor cu polizaharidele, reunite între ele prin legături saline. Este de menţionat că mucopolizaharidele au la bază un principiu de structură comun, caracterizat prin repetarea unor unităţi de dizaharide substituite : acizii uronici legaţi de oze aminate şi acetilate, în timp ce glicoproteinele au la bază un alt principiu de organizare şi anume o coloană macromoleculară polipeptidică (1.3.5.2.1.).

După natura lor, mucopolizaharidele se pot clasifica în *neutre* şi *acide*. Din prima categorie sînt de interes special cele care conţin glucozamină şi galactozamină, de obicei sub formă acetilată. *Mucopolizaharidele acide* sînt heteroglicani formaţi din unităţi dizaharidice, care se repetă cu o alternanţă regulată şi sînt constituite dintr-un acid uronic şi o hexozamină *(Jeanloz R.W., 1962)* ; toate sînt sulfatate, cu excepţia acidului hialuronic.

Ca metodă generală de preparare s-a utilizat, iniţial, extragerea cu soluţii saline sau hidroliza alcalină menajată, urmată de precipitarea cu acetonă. Metodele actuale comportă următoarele operaţii : extragerea cu soluţii saline, distrugerea părţii proteice prin proteoliză (tripsină, papaină, pronază), precipitarea sub formă de complecşi cu sărurile de amoniu cuaternare (sau cu alţi agenţi, ca de exemplu, clorură de 9-aminoacridină sau lactat de diaminoetoxiacridină). Separarea în diferite grupe se face pe baza diferenţei de solubilitate a sărurilor de Na, Ca sau Ba în etanol de concentraţii diferite sau a complecşilor cu sărurile de amoniu în soluţii de molaritate crescîndă. Rezultate bune dă separarea prin cromatografie (de exemplu, pe rezină Dowex-Cl^-, pe Ecteolaceluloză, DEAE-Sephadex etc.) ; de asemenea electroforeza preparativă *(J. C. Jardillier, J. Agneray, R. Havez*, 1970). Pentru stabilirea structurii se foloseşte metilarea cu sulfat de metil la temperaturi joase *(Haworth)* sau hidroliza cu enzime specifice, de exemplu β-glucuronidază *(A. Linker, K. Meyer, P. Hoffman*, 1960).

Scanned with OKEN Scanner

Pentru unele mucopolizaharide (dermatansulfați) s-a determinat structura spațială *(E. Davidson, 1965)*, observîndu-se că cele două cicluri sînt în formă de „scaun" și radicalii $-NH_2$, $-COO^-$ și $-SO_3^-$ în poziție axială, explicînd marea lor reactivitate.

Importanța biologică a mucopolizaharidelor rezultă nu numai din rolul plastic, de structurare a țesutului conjunctiv și cartilajelor, ci și din funcțiile pe care le îndeplinesc în organism în: permeabilitatea vaselor, controlul și menținerea apei și electroliților extracelulari, calcefiere, protecția mecanică și termică a unor țesuturi, menținerea constanței lichidelor oculare, reacții imunologice, coagularea sîngelui etc. Multe din aceste proprietăți se datoresc structurii lor polianionice („schimbători de cationi").

Mucopolizaharide acide

Sînt alcătuite din unități dizaharidice, substituite *(1.1.4.3., figura 1.19)*

Acidul hialuronic (*hyalos* = sticlă), inițial izolat din umoarea sticloasă (vitroasă) a ochiului de bovine, este larg răspîndit în țesutul conjunctiv (legat de proteine), cartilaje, cornee, lichidul sinovial, cordonul ombilical etc.

Molecula sa este alcătuită dintr-o structură de bază dizaharidică, formată din acid glucuronic legat β 1 → 3 de glucozamina-N-acetilată *(fig. 1.19.)* Acest dizaharid substituit, *acidul hialobiuronic*, se repetă într-un număr mare, prin legături β 1 → 4, astfel că greut. mol. a acidului hialuronic este peste 50.000, în majoritatea cazurilor peste 1.000.000. Datorită acestei structuri, prezintă soluții vîscoase, chiar la concentrații mici (0,2%) explicînd astfel rolul său în organizarea unor țesuturi, sub formă de fibre și rețele, care constituie bariere impermeabile, de separare și protecție, ce devin permeabile sub acțiunea enzimelor specifice de tipul *hialuronidazei*. Sub acțiunea hialuronidazei, obținută din testicule, la pH=5, se rupe legătura β 1 → 4 dintre acidul glucuronic și glucozamină și se formează o serie de oligozaharide, mai ales tetrazaharide, cu o hexozamină la extremitatea reducătoare; hialuronidaza din bacterii hidrolizează acidul hialuronic pînă la dizaharide cu ciclul glucuronic nesaturat în poziția 4—5. Complexul cu proteinele *(Ogston,* 1950) are aproximativ 25% proteine legate între două fragmente ionice *(P. A. Swann, 1968)*. În mediu acid, formează un coagul mucilaginos.

Biosinteza acidului hialuronic are loc la nivelul fibroblastelor și are o „jumătate a timpului de reînnoire" scurtă (2 zile), ceea ce impune formarea sa continuă. Importanța sa biologică este corelată cu aceea a hialuronidazelor.

Acizii condroitinsulfurici (condroitinsulfații) sînt alcătuiți din acid glucuronic legat β 1 → 3 de N-acetil-glucozamina; aceste unități dizaharidice se leagă între ele β 1 → 4 *(fig. 1.19)*. După poziția sulfatului de la hexozamină se cunosc două forme: condroitin-4-sulfații și condroitin-6-sulfații, ambele sensibile la acțiunea hialuronidazei testiculare.

Denumirea de *condroitină* se atribuie mucopolizaharidelor nesulfatate, cu unitatea de bază *condrozina* (mai ales în cartilaje).

Prin esterificarea unor oxidrili cu acid sulfuric se obțin *condroitinsulfații* cu gr. mol. în jur de 250.000; după poziția ocupată de radicalul sulfat sînt de mai multe feluri: A, B, C, D.

Condroitinsulfatul A (CSA-A) este alcătuit din acid glucuronic și N-acetil-glucozamină sulfatată în poziția 4.

Condroitinsulfatul C (CSA-C) are o structură asemănătoare cu CSA-A, dar cu acidul sulfuric în poziția 6.

Condroitinsulfatul B (CSA-B) sau *Dermatansulfat* diferă de precedenții

avînd în locul acidului glucuronic un stereoizomer al acestuia la C_5, acidul iduronic *(fig. 1.19)*. Dă o coloraţie mai slabă în reacţia Dische la carbazol şi este numai parţial hidrolizat de către hialuronidază. O excreţie urinară crescută a CSA-B se observă în boala *Hurler* (lipocondrodistrofie), caracterizată prin infiltraţia lipidică a unor ţesuturi şi organe (ficat, splină, cornee), condrodistrofie, tulburări psihice (oligofrenie, debilitate mintală progresivă), nanism etc. Boala se instalează în primele 3—4 luni de viaţă şi bolnavul nu depăşeşte, de obicei vîrsta de 20 de ani ; cauza decesului este insuficienţa circulatorie sau boli ale aparatului respirator. Ca mecanism biochimic al bolii, creşterea dermatansulfatului în anumite ţesuturi şi în urină şi structura sa diferită — cu o gr. mol. mai mică (aprox. 5.000), asemănătoare produsului format *in vitro* de hialuronidază — pledează pentru o alterare a enzimelor lizozomilor, care sînt incapabile să producă degradarea lor completă, ceea ce are ca urmare acumularea tisulară şi creşterea excreţiei urinare *(J. Knecht, J. A. Cifonelli, A. Dorfman, 1967)*.

Condroitinsulfatul D (CSA-D) conţine mai mulţi esteri sulfurici.

Keratansulfaţii se aseamănă cu condroitinsulfaţii dar sînt lipsiţi de acidul glucuronic, în locul căruia apare galactoza legată β 1 → 4 de glucozamina-N-acetilată şi sulfatată *(fig. 1.19)*.

După originea lor se cunosc două tipuri : I şi II.

Keratansulfatul I cu o structură neramificată se poate extrage din cornee, unde există în stare aproape pură.

Keratansulfatul II se găseşte în cartilaje, sub formă de agregate cu condroitinsulfaţii. Prezintă ramificaţii care conţin în poziţia terminală acid sialic, galactoză (adesea sulfatată în poziţia 6), L-fucoză *(V.P. Bhauanadan, K. Meyer, 1968)*. Prin pierderea grupărilor sulfat, primeşte proprietăţile substanţelor „grupelor sanguine". Proporţia keratansulfaţilor din cartilaje creşte mult în boala *Marfan* care prezintă modificări complexe : oculare (luxaţii bilaterale ale cristalinului, dezlipirea corneei, microoftalmie), alungirea şi subţierea oaselor, în special a degetelor care sînt cu 8—15 cm mai lungi decît cele normale (arahnodactilie), dezvoltarea insuficientă a musculaturii, absenţa aproape completă a ţesutului adipos, curbarea coloanei vertebrale, picior plat, malformaţii cardiace congenitale, deformarea urechilor, astenie, infantilism. Este interesant că aceste tulburări, în mare măsură datorate defectelor de dezvoltare ale mezodermului, apar toate la acelaşi individ.

Condroitinsulfaţii sînt, în general, legaţi în ţesuturi de proteine şi datorită caracterului acid imprimat de grupările sulfurice joacă un rol de „schimbători de cationi" în cartilaje. „Jumătatea de viaţă" este de 8 zile în piele şi 16 zile în cartilaje.

Heparina. Molecula heparinei prezintă asemănare cu mucopolizaharidele acide, fiind alcătuită din acid glucuronic şi glucozamină sulfatată *(fig. 1.19)*. În preparatul obţinut ca sare de Na sau K, după delipidarea şi autoliza plămînului de animale *(J. E. Scott, T. E. Stancey, M. Tigwell, 1968)*, unitatea de bază ar fi acidul glucuronic legat α 1 → 4 cu glucozamina sulfatată în proporţii diferite în poziţia 6 (O-sulfat) şi 2 (N-sulfat). Se menţionează că ar avea şi legături β-ozidice, caracteristice polizaharidelor de structură *(Danishefsky I., Seteiner H., 1965)*. Structura sa nu prezintă o alternanţă regulată din cauza legăturilor 1 → 6 şi 1 → 3 şi a neregularităţii de sulfatare ; în regiunile de sulfatare puternică acidul glucuronic este sulfatat în 2 sau 3 şi glucozamina în 3, sau în 3 şi 6 *(C. P. Dietrich, 1968)* şi, în plus, se menţionează posibilitatea apariţiei acidului iduronic, a structurilor ramificate şi a unor legături eterice β ozidice *(A. B. Forster, I. M.*

Scanned with OKEN Scanner

Weber, 1966). Ar avea formula brută: $(C_{24}H_{31}O_{35}N_2S_5Na_7)_n^-$ şi gr. mol. 12.000—16.000 *(M.L. Wolfram, 1950)*.

Produsul înscris în F.R.IX sub denumirea de *Heparinum natricum (heparină sodică)* este definit ca un amestec de săruri de Na ale unor mucopolizaharide sulfatate, acide, obţinute din organe animale, cu proprietatea de a prelungi timpul de coagulare al sîngelui. Se prezintă ca o pulbere albă sau alb-gălbuie, higroscopică, cu miros foarte slab caracteristic, solubilă 1 p. în 20 p. apă şi practic insolubilă în alcool, eter, cloroform; $[\alpha]_D^{20} = +35°$ pînă la $+55°$ (c = 4% în apă). Dozarea se face prin metoda biologică în care se urmăreşte prelungirea timpului de coagulare *in vitro* faţă de soluţii etalon cu 1,28—1,60 şi 2,0 U.I. heparină/ml; o unitate internaţională (U.I.) corespunde la 0,0077 mg heparină (etalon internaţional). Metoda prevede utilizarea sîngelui de bovine recoltat pe Na_2SO_4 calcinat, în prezenţă de extract de creier, cu acţiune tromboplastinică. Conservarea se face în fiole sau flacoane bine închise, sub 25° şi se prevede conţinutul în U.I./mg şi termenul de valabilitate.

Heparina farmaceutică se găseşte în soluţie injectabilă apoasă (5.000 U.I. heparinum natricum/ml). Acţiunea majoră este cea *anticoagulantă* şi de *factor lipolitic*, cu indicaţii în infarctul miocardic, ateroscleroză, tromboze arteriale şi venoase, tromboembolii acute postpartum şi pentru prevenirea coagulării intravasculare (de exemplu în şocurile infecţioase, chirurgicale). Se utilizează în laboratorul clinic ca anticoagulant în recoltarea sîngelui pentru diferite analize.

Heparina lipocaică este o asociere de heparină (1.000 U.I.) şi factor lipocaic de origine pancreatică (20 mg pe comprimat), cu efecte asupra β-lipoproteinelor transportoare de colesterol (pe care le reduc) şi de normalizare a raportului: fosfolipide/colesterol. Este indicată în ateroscleroză, hiperlipidemii esenţiale, arterită şi, în general, în toate stările cu alterări ale fosfolipidelor şi colesterolului.

În organismele animale şi la om se întîlnesc heparine care diferă între ele prin gradul de N — şi O-sulfatare a glucozaminei şi extinderea sulfatării la C_2 din acidul glucuronic, răspîndite în plămîni, ficat, muşchi, cu localizare în celulele mastocite.

Heparina este uneori însoţită de *heparitin-sulfaţi* (plămîn, aortă etc.) care au fixaţi pe grupările $^-NH_2$ ale glucozaminei, în parte acid sulfuric, şi în parte acid acetic. Este posibil ca ei să fie precursori în biosinteza heparinei *(Siebert)*.

S-a propus denumirea de *Heparan (Jeanloz)* pentru produsul cu gr.mol. 20.000, alcătuit din unităţi de acid glucuronic legate mai ales β 1 → 6 la glucozamina N-acetilată *(fig. 1.19.)*. Ar avea legături 1—4 alături de cele 1—6 şi sulfatarea ar fi neregulată şi s-ar putea să prezinte ramificaţii. Este rezistent la hialuronidază şi poate să apară în boala *Hurler* sub o formă cu gr. mol. mică, de aproximativ 2.000.

ω-*Heparina*, izolată de la balenă *(Josizawa)* are un schelet polizaharidic alcătuit din glucozamină-N-acetilată pe care se prind lanţuri de β-heparină. Are gr. mol. sub 10.000 şi o putere anticoagulantă dublă faţă de heparina obişnuită.

Heparinele au rol de coenzimă în sistemul lipoproteinlipază ce acţionează asupra chilomicronilor din plasmă (hidroliza trigliceridelor), servind la înlăturarea tulburării produse de chilomicroni, de unde denumirea de *factor de clarefiere*.

Pe lîngă heparinele naturale s-au obţinut produşi sintetici denumiţi *heparinoide*, cu acţiune anticoagulantă ce împiedică transformarea protrombinei în trombină, probabil prin „neutralizarea" tromboplastinei. Toxicitatea lor creşte în paralel cu gr. mol., de aceea în practică se utilizează preparatele cu gr. mol. sub 40.000. De aici rezultă limitarea şi prudenţa ce se impune în utilizarea heparinoidelor sintetice, deoarece apare riscul instalării trombocitopeniei, leucopeniei, a emboliilor viscerale etc. Este de menţionat că asemenea fenomene pot apare şi cu alte tipuri de macropolimeri din cauza formării unor complecşi cu proteinele plasmatice şi a aglutinării plăcuţelor sanguine.

Mucopolizaharide neutre. Aceste mucopolizaharide conţin glucozamină, manoză, L-fucoză, acid neuraminic (acetilat sau legat cu acidul glucuronic); în

Scanned with OKEN Scanner

general, însă, sînt lipsite de acidul glucuronic şi nu sînt sulfatate. În majoritate, se găsesc sub formă de complecşi cu proteinele în piele şi ţesutul conjunctiv şi prezintă asemănări cu mucoidele din salivă, tractul gastrointestinal, secreţiile nazale, chistele ovariene şi cu glicoproteidele sanguine (a se vedea şi 1.3.).

1.1.4.7. HETEROZIDE (Glicozide)

Sub denumirea de *glicozide* au fost reunite substanţele izolate în special din vegetale, care prin hidroliză dau zaharuri reducătoare şi o parte neglucidică denumită *aglicon*. În prezent este folosită denumirea de *heterozide*.

Proprietăţile lor depind, în cea mai mare măsură, de natura agliconului, pe baza căruia se face şi clasificarea lor în heterozidele fenolilor ; cianogenetice ; sulfurate ; cumarinice şi cromanice (coloranţi vegetali, antociani) ; heterozide cardiotonice (steroidice).

Asupra unora din aceste heterozide, care prezintă interes pentru biochimia umană, se va reveni în unele capitole (*Metabolisme intermediare, Biochimia ţesuturilor* etc.).

Scanned with OKEN Scanner

1.2. LIPIDELE

1.2.1. CRITERII DE DEFINIRE A LIPIDELOR

Lipidele sînt constituenţi esenţiali ai organismelor vii. Spre deosebire de glucide şi proteine, care pot fi definite prin produşii lor de hidroliză, această clasă este foarte eterogenă şi cuprinde compuşi destul de diferiţi între ei, avînd ca singur element comun *acizii graşi*. Criteriile de definire se referă, pe de o parte, la proprietăţile lor de ordin fizic şi anume, solubilitatea (în formă anhidră) în solvenţii organici (apolari) şi insolubilitatea în apă — cu menţiunea că majoritatea lipidelor biologice importante pentru om au un caracter amfifil (polar), datorită căruia „leagă" apa-şi, pe de altă parte, la anumite caracteristici biologice-metabolice similare.

Extragerea lipidelor comportă, în principiu, mai multe operaţii: omogenizarea ţesuturilor, deshidratarea (la temperatura potrivită şi eventual în vid, urmată de triturarea cu Na_2SO_4 anhidru) şi tratarea, în mai multe reprize, cu un solvent care permite extragerea ansamblului lipidelor, de exemplu, cu un amestec de benzen : heptan : etanol (la fierbere). Extractele se evaporă şi se usucă la vid, obţinîndu-se asftel *fracţiunea lipidică totală*. Prelucrarea în continuare necesită tratarea cu KOH sau NaOH, care saponifică unele lipide şi nu afectează altele, şi extragerea cu solvenţi potriviţi (de exemplu hexan, oxid de etilen) ceea ce permite obţinerea unor grupe de fracţiuni în care sînt concentrate anumite tipuri de lipide *(tabelul 1.9)*.

TABELUL 1.9

Schema de fracţionare a lipidelor animale

FRACŢIUNEA LIPIDICĂ TOTALĂ
(se obţine cu amestec benzen/heptan/etanol)

↓ Fierbere cu KOH/etanol, diluarea soluţiei alcaline cu apă şi extragere cu hexan sau oxid de etilen

Lipide din fracţiunea hidroalcoolică alcalină	*Lipide din faza apolară sau „fracţiunea insaponificabilă"*
↓ acidifiere	
solubile în fracţiunea hidroalcoolică *Conţine:* compuşii proveniţi din hidroliza lipidelor: glicerol, inozitol, glucide, acid fosforic liber sau acizi glicerofosforici, Compuşi azotaţi (colina, colamina, serina)	*Faza lipidică insolubilă în etanol-apos*, extractibil cu benzen sau oxid de etilen *Conţine:* Acizi alifatici cu lanţ lung (acizi graşi)
	Conţine: alcooli alifatici superiori (alcooli graşi), alcooli alil-ciclici: steroli, oxicaroteni, vitamine A, D, E; hidrocarburi (în special caroteni)

Scanned with OKEN Scanner

Lipidele adevărate (care există înainte de hidroliză, respectiv saponificare) se clasifică în *lipide simple* și *lipide complexe* (conjugate), iar cele care păstrează și după hidroliză caracterele fundamentale ale lipidelor sînt denumite *lipide derivate.*

Pe lîngă solubilitatea lor în solvenții lipidelor : benzen, eter, cloroform, tetraclorură de carbon, hexan, oxid de etilen etc., caracterizarea lipidelor se referă și la proprietățile lor biologice. În general, lipidele sînt componenți ai tuturor structurilor celulare, predominînd în celulele adipoase ; sînt și rezerve importante de energie pentru organism ; au rol în protecția termică, mecanică și de susținere pentru unele organe (rinichi) și de „barieră" hidrică (piele). Mecanismele de digestie-absorbție, biosinteză, posibilitatea de transformare a unora în altele, căile de metabolizare similare, constituie de asemenea criterii care pot servi pentru delimitarea și clasificarea unor substanțe, cu structuri diferite, în această clasă. Un component cvasiuniversal al lipidelor este reprezentat de grupul *acizilor grași (A.G.)*, de obicei cu număr pereche de atomi de carbon. Tot aici aparțin și PROSTAGLANDINELE (vol. II)

Acizii grași se clasifică în *aciclici* (liniari sau ramificați) și *ciclici ;* după gradul de saturare : *saturați* sau *nesaturați* (cu una sau mai multe legături duble) și după eventuala prezență a unor funcțiuni secundare, ca de exemplu, oxidril, cetonă etc.

În privința *nomenclaturii* se utilizează regulile generale din chimia organică, indicîndu-se numărul de atomi de C și folosind sufixul „-oic", de exemplu acidul octadecanoic, sau unele numiri uzuale (în cazul de față, acid stearic) și, dacă este cazul, se notează prin Δ dublele legături, specificînd pozițiile în care se găsesc [de exemplu Δ, 9—10].

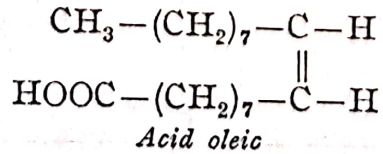
1.2.2. ACIZII GRAȘI

Acizii grași care apar mai frecvent în diferite lipide (în special din organismele animale sau alimente), cu indicarea structurii și denumirii lor sînt prezentați în *tabelul 1.10.*

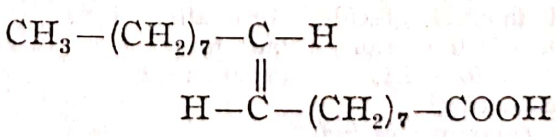
a. Cu privire la *răspîndirea* acizilor grași saturați se constată că în lipidele de origine vegetală predomină acidul palmitic ; la animalele cu sînge rece, de asemenea acidul palmitic, urmat de acidul miristic ; în lipidele animalelor cu sînge cald (inclusiv la om) predomină acidul palmitic, urmat de acidul stearic și în cantități mai mici acidul miristic.

Dintre acizii grași nesaturați, cei mai abundenți la om sînt cei cu 18 atomi de C (oleic, linoleic) ; în unele lipide complexe (sfingomieline, cerebrozide) se găsesc acizii grași cu 24 atomi de C : saturați, nesaturați și hidroxilați.

Datorită prezenței dublei legături, acizii grași nesaturați pot apare sub formă de izomeri. Astfel, de exemplu, acidul C_{18}, cu dublă legătură între 9—10, apare sub formă *cis* (ac. oleic) și *trans* (ac. elaidic) :



Acid oleic



Acid elaidic

Acizii grași: denumire și structură TABELUL 1.10

I. Acizii grași saturați și derivați

Nr. at. C	Denumire comună (Denumire sistematică)	Formula	Structura
2	Ac. acetic (ac. etanoic)	$C_2H_4O_2$	CH_3COOH
3	Ac. propionic (ac. propanoic)	$C_3H_6O_2$	CH_3CH_2COOH
4	Ac. butiric (ac. butanoic)	$C_4H_8O_2$	$CH_3(CH_2)_2COOH$
	Ac. izobutiric (ac. 2-metilpropanoic)	$C_4H_8O_2$	$(CH_3)_2CHCOOH$
	Ac. 3-hidroxibutiric (ac. rac-3-hidroxibutanoic	$C_4H_8O_3$	$CH_3CH(OH)CH_2COOH$
5	Ac. valeric (valerianic) (ac. pentanoic)	$C_5H_{10}O_2$	$CH_3(CH_2)_3COOH$
6	Ac. caproic (ac. hexanoic)	$C_6H_{12}O_2$	$CH_3(CH_2)_4COOH$
7	Ac. enantic (ac. heptanoic)	$C_7H_{14}O_2$	$CH_3(CH_2)_5COOH$
8	Ac. caprilic (ac. octanoic)	$C_8H_{16}O_2$	$CH_3(CH_2)_6COOH$
9	Ac. pelargonic (ac. nonanoic)	$C_9H_{18}O_2$	$CH_3(CH_2)_7COOH$
10	Ac. capric (ac. decanoic)	$C_{10}H_{20}O_2$	$CH_3(CH_2)_8COOH$
11	Ac. hendecanoic (ac. undecanoic)	$C_{11}H_{22}O_2$	$CH_3(CH_2)_9COOH$
12	Ac. lauric (ac. dodecanoic)	$C_{12}H_{24}O_2$	$CH_3(CH_2)_{10}COOH$
13	— (ac. tridecanoic)	$C_{13}H_{26}O_2$	$CH_3(CH_2)_{11}COOH$
14	Ac. miristic (ac. tetradecanoic)	$C_{14}H_{28}O_2$	$CH_3(CH_2)_{12}COOH$
	Ac. izomiristic (ac. 12-metiltridecanoic)	$C_{14}H_{28}O_2$	$(CH_3)_2CH(CH_2)_{10}COOH$
15	— (ac. pentadecanoic)	$C_{15}H_{30}O_2$	$CH_3(CH_2)_{13}COOH$
	— (ac. 12-metiltetradecanoic)	$C_{15}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2CH(CH_3)(CH_2)_{10}COOH$
16	Ac. palmitic (ac. hexadecanoic)	$C_{16}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_{14}COOH$
	Ac. izopalmitic (14-metilpentadecanoic)	$C_{16}H_{32}O_2$	$(CH_3)_2CH(CH_2)_{12}COOH$
17	Ac. margaric (ac. heptadecanoic)	$C_{17}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_{15}COOH$
18	Ac. anteizomargaric Ac. stearic (ac. octadecanoic)	$C_{17}H_{34}O_2$ $C_{18}H_{36}O_2$	$CH_3CH_2CH(CH_3)(CH_2)_{12}COOH$ $CH_3(CH_2)_{16}COOH$
	Ac. izostearic (ac. 16-metilheptadecanoic)	$C_{18}H_{36}O_2$	$(CH_3)_2CH(CH_2)_{14}COOH$
19	— (ac. nonadecanoic)	$C_{19}H_{38}O_2$	$CH_3(CH_2)_{17}COOH$
20	Ac. arachidic (ac. eicosanoic)	$C_{20}H_{40}O_2$	$CH_3(CH_2)_{18}COOH$
21	— (ac. heneicosanoic)	$C_{21}H_{42}O_2$	$CH_3(CH_2)_{19}COOH$

Scanned with OKEN Scanner

(continuare) TABELUL I.10

Nr. at. C	Denumire comună (Denumire sistematică)	Formula	Structura
22	Ac. behenic (ac. docosanoic)	$C_{22}H_{44}O_2$	$CH_3(CH_2)_{20}COOH$
23	— (ac. tricosanoic)	$C_{23}H_{46}O_2$	$CH_3(CH_2)_{21}COOH$
24	Ac. lignoceric (ac. tetracosanoic)	$C_{24}H_{48}O_2$	$CH_3(CH_2)_{22}COOH$
26	Ac. cerotic	$C_{26}H_{52}O_2$	$CH_3(CH_2)_{24}COOH$

II. Acizi graşi nesaturaţi

Nr. at. C / Nr. d. leg.	Denumirea comună (Denumirea sistematică)	Formula	Structura
14/1	Ac. miristoleic (cis-9-tetradecenoic)	$C_{14}H_{26}O_2$	$CH_3(CH_2)_3C(H)=C(H)(CH_2)_7COOH$
16/1	Ac. palmitoleic (cis-9-hexadecenoic)	$C_{16}H_{30}O_2$	$CH_3(CH_2)_5C(H)=C(H)(CH_2)_7COOH$
	Ac. palmitelaidic (trans-9-hexadecenoic)	$C_{16}H_{30}O_2$	$CH_3(CH_2)_5C(H)=C(CH_2)_7COOH$
18/1	Ac. petroselinic (cis-6-octadecenoic)	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_{10}C(H)=C(H)(CH_2)_4COOH$
	Ac. oleic (cis-9-octadecenoic)	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_7C(H)=C(H)(CH_2)_7COOH$
	Ac. elaidic (trans-9-octadecenoic)	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_7C(H)=C(CH_2)_7COOH$
	Ac. cis-vaccenic (cis-11-octadecenoic)	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_5C(H)=C(H)(CH_2)_9COOH$
18/2	Ac. trans-vaccenic (trans-11-octadecenoic)	$C_{18}H_{34}O_2$	$CH_3(CH_2)_5C(H)=C(CH_2)_9COOH$
	Ac. linoleic (ac. cis-9-cis-12-octadecadienoic)	$C_{18}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4(C(H)=C(H)CH_2)_2-(CH_2)_6COOH$
	Ac. linoelaidic (ac. trans-9-trans-12-octadecadienoic)	$C_{18}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4(C(H)=C(H)CH_2)_2-(CH_2)_6COOH$

Nr.at. C / Nr.d. leg.	Denumirea comună (Denumirea sistematică)	Formula	Structura
18/3	Ac. linolenic (ac. all-cis-9, 12, 15-octadecatrienoic)	$C_{18}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2(C{=}CCH_2)_3(CH_2)_6COOH$ (H H)
20/1	— — — (cis-5-eicosenoic)	$C_{20}H_{38}O_2$	$CH_3(CH_2)_{13}C{=}C(CH_2)_3COOH$ (H H)
	Ac. eicosenoic (cis-11-eicosenoic)	$C_{20}H_{38}O_2$	$CH_3(CH_2)_7C{=}C(CH_2)_9COOH$ (H H)
20/4	Ac. arachidonic (ac. all-cis-9, 8, 11, 14-eicosatetraenoic)	$C_{20}H_{32}O_2$	$CH_3(CH_2)_4(C{=}CCH_2)_4{-}(CH_2)_2{-}COOH$ (H H)
20/5	Ac. eicosapentaenoic (all-cis-5, 8, 11, 14, 17-eicosapentaenoic)	$C_{20}H_{30}O_2$	$CH_3CH_2C{=}C(CH_2)_5(CH_2)_2COOH$ (H H)
22/1	Ac. erucic (cis-13-docosenoic)	$C_{22}H_{42}O_2$	$CH_3(CH_2)_7C{=}C(CH)_2)_{11}COOH$ (H H)
22/5	Ac. clupanodonic (ac. 4, 8, 12, 15, 19-docosapentaenoic)	$C_{22}H_{34}O_2$	$CH_3{-}CH_2C{=}C(CH_2)_2C{=}CCH_2C{=}C{-}$ (H H H H H H) $-(CH_2)_2CH{=}CH(CH_2)_2CH{=}CH{-}$ $-(CH_2)_2{-}COOH$
22/6	Ac. docosahexaenoic (all-cis-4, 7, 10, 13, 16, 19-docosahexaenoic)	$C_{22}H_{32}O_2$	$CH_3CH_2(C{=}CCH_2)_6CH_2COOH$ (H H)
24/1	Ac. nervonic (cis-15-tetracosenoic)	$C_{24}H_{40}O_2$	$CH_3(CH_2)_7C{=}C(CH_2)_{13}COOH$ (H H)

/după „Specifications and criteria for biochemical compounds" Ed. National Academy of Sciences, Washington, 1972, 125—129/

Acidul oleic este larg răsplîndit în lipidele naturale, în timp ce acidul elaidic apare în lipidele animale numai dacă a fost introdus prin alimentație.

Acidul palmitoleic, omologul cu 16 atomi de C al acidului oleic, este tot de formă *cis* și se găsește în proporții diferite în lipidele din organele animalelor cu sînge cald.

Acidul vaccenic, izolat din grăsimile din lapte *(Bertram,* 1928) este un izomer de poziție al acidului oleic, avînd Δ_{11-12} (în loc de 9—10) și este unul din puținii acizi grași de formă *trans*.

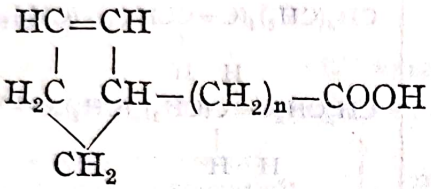
F.R.IX înscrie produsul *Stearinum (Acidum stearicum, stearină, acid stearic)* ca un amestec de acizi grași solizi: stearic, palmitic și alți acizi grași saturați, în cantitate mică. Se prezintă ca o masă albă sau slab gălbuie, dură, cu fractură cristalină sau pulbere cu aspect cristalin, onctuoasă la pipăit, cu p.t. 56°—70°, practic insolubilă în apă, dar solubilă în alcool (1 p în 21 p), eter (1 p în 3 p) și cloroform (1 p în 2 p).

Scanned with OKEN Scanner

b. Acizii graşi cu funcţii secundare. În decursul metabolizării, acizii graşi apar ca intermediari β-hidroxilaţi şi β-cetonici, dar aceştia fiind legaţi în complexele multienzimatice şi avînd un *turn-over* ridicat nu se găsesc, în general, în stare liberă şi nici în compoziţia lipidelor naturale.

În unele cazuri (de exemplu, în lanolină) s-au găsit acizi graşi hidroxilaţi în poziţia β, ca de exemplu, acidul β-hidroximiristic, α-hidroxipalmitic şi α-hidroxiarachidonic. În structura cerebrozidelor intră acizii graşi C_{24} hidroxilaţi: acidul α-hidroxilignoceric (saturat) şi acidul α-hidroxinervonic (nesaturat). Acidul ricinoleic (12-hidroxioleic) reprezintă 92% din acizii uleiului de ricină şi îi conferă viscozitatea caracteristică.

Acizii alil-ciclici conţin în molecula lor o parte ciclică şi un lanţ lateral:



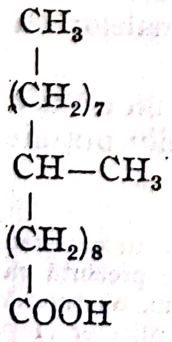
n = 10: *acidul hidnocarpic*
n = 12: *acidul chaulmogric*

Au fost izolaţi din plantele tropicale *(Hydnocarpus)* şi se folosesc în tratamentul leprei.

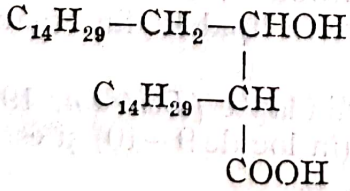
c. Acizii graşi mai rari. Din grupul acizilor graşi ramificaţi face parte *acidul izovalerianic* sau *focenic* obţinut de *Chevreul* (1823) din uleiul de *Phocena phocena* (marsuin, un mamifer cetaceu asemănător delfinului); ulterior s-a găsit şi în lipidele secretate de oaie. În untul de vacă apar acizi graşi ramificaţi cu număr impar de atomi de carbon: C_{13}, C_{15}, C_{17}. Începînd numerotarea de la carboxil, acizii cu o grupare metil la penultimul atom de C din lanţ se numesc *izo*, iar cei cu metilul la C antepenultim se numesc *ante-izo-*.

Acizi graşi cu număr nepereche de atomi de carbon (cei naturali sînt aproape exclusiv cu număr pereche) şi nesaturaţi, cum ar fi de exemplu acidul *undecilenic*: $CH_2=CH-(CH_2)_8-COOH$, s-au găsit în grăsimea omului adult, lipsind în grăsimea de la copii. Avînd proprietăţi fungistatice este utilizat sub formă de săruri de Ca şi Zn în tratamentul micozelor. Din grăsimile părului (lînii) s-au izolat peste 30 de acizi graşi între care acizii graşi nesaturaţi cu număr nepereche de atomi de C reprezintă aproximativ 15%.

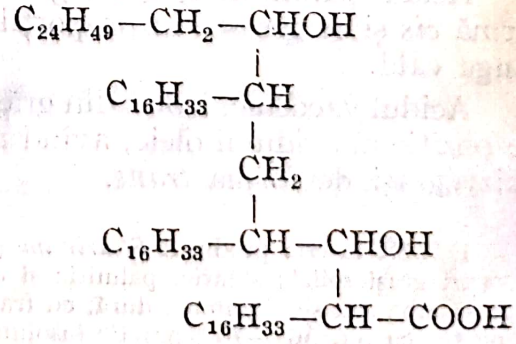
În compoziţia lipidelor din microorganisme s-au găsit acizi graşi cu structură specială, de exemplu în bacilul leprei şi al tuberculozei: *acidul tuberculostearic* (acidul 10-metilstearic); în bacilul tuberculozei bovine, *acidul micotic*; în bacilul difteric, *acidul corinomicotic*, cu următoarele formule:



Ac. tuberculostearic



Ac. corinomicotic



Ac. micotic

d. Acizi grași esențiali (A.G.E., Vitamina F).

Organismul uman (și al unor animale) are nevoie de unii acizi grași pe care nu îi poate sintetiza sau pe care îi produce în cantități insuficiente, ceea ce impune aportul lor prin alimentație, de unde denumirea de *acizi grași esențiali* (A.G.E.). Deoarece lipsa lor din alimentație conduce la stări carențiale similare avitaminozelor, au fost considerați ca *vitamina F*, denumire improprie fiindcă nu sînt respectate toate cerințele pentru a reprezenta o vitamină (2.1.5). Din grupul acizilor grași esențiali fac parte acizii C_{18}: *linolic* (cu 2 duble legături și indicele de iod, I.I. 181,4), *linolenic* (3 duble leg, I.I. 273), *eleostearic* (3 duble leg.), *parinaric* (4 duble leg.), *licanic* (cu 3 duble leg. și o grupare cetonică); C_{20}: *acidul arachidonic* (cu 4 duble leg.; I.I. 334), *acidul eicosapentenoic* (cu 5 duble leg.); C_{22}: acidul clupanodonic (cu 5 duble legături în 4, 8, 12, 15 și 19) *și acidul docosahexaenoic* (cu 6 duble legături) *(Tabelul 1.10)*.

În organism se pot transforma unii acizi grași esențiali în alții. Simptomele carenței A.G.E. se manifestă la om cînd cantitatea de acid linoleic scade sub limita de 1—2% din aportul caloric; pentru acidul arachidonic necesitățile sînt de 1/3 din cele pentru acidul linoleic. Rolul A.G.E. este în special structural, făcînd parte din alcătuirea fosfolipidelor celulare, mai ales mitocondriale.

c. Proprietățile acizilor grași.

Solubilitatea. Acizii inferiori sînt solubili în apă (de fapt acești acizi: formic, acetic, propionic nu sînt „acizi grași" în accepția biochimică, deoarece nu apar în structura lipidelor); cu creșterea numărului de atomi de C scade solubilitatea în apă și crește solubilitatea în solvenții organici apolari sau puțin polari *(Tabelul 1.11)*. Solubilitatea scade în paralel cu temperatura, de exemplu, acidul oleic se dizolvă în acetonă în proporție de 14,2% la —30° și numai 0,40% la —70°, proprietate ce servește la obținerea acizilor grași prin cristalizare fracționată la temperaturi joase *(Brown, 1944)*.

TABELUL 1.11

Solubilitatea unor acizi grași în diferiți solvenți organici (g acid disolvat în 100 g solvent la 20°; după **Markely, din M. Javillier și colab.**).

Nr. at. C / Solvent	C_{10}	C_{12}	C_{14}	C_{16}	C_{18}
Metanol	510	120	17,3	3,7	0,1
Etanol 99,5	—	105	23,9	7,21	2,25
Etanol 95	440	91,2	18,9	4,93	1,13
Acetona	407	60,5	15,9	5,38	1,54
Benzen	398	93,6	29,2	7,30	2,46
n. Heptan	342	68	24,5	6,5	2,4
Cloroform	326	83	32,5	15,1	6,0
Acid acetic 99,5	567	81,8	10,2	2,14	0,12
Acetat de etil	289	52	15,3	6,1	0,5

Proprietăți spectrale. Acizii grași în stare pură sînt incolori și nu absorb lumina în spectrul vizibil; în I.R. au benzi caracteristice, de interes pentru dozarea acizilor grași cu duble legături de tip *trans;* în U.V. (200—400 nm) acizii grași saturați, mono și polinesaturați (cu duble legături izolate) nu prezintă spectre caracteristice, în schimb cei cu duble legături conjugate prezintă asemenea spectre: cei cu un sistem dienic conjugat au un pic net la 232 nm; cei cu

Scanned with OKEN Scanner

trei duble legături conjugate au un pic principal la 268 nm, încadrat între două picuri secundare ; cei cu patru duble legături conjugate au două maxime de absorbție, la 300 și 316 nm. Asemenea absorbții caracteristice permit dozarea lor în amestecuri, dar metoda preferată în prezent este gazcromatografia.

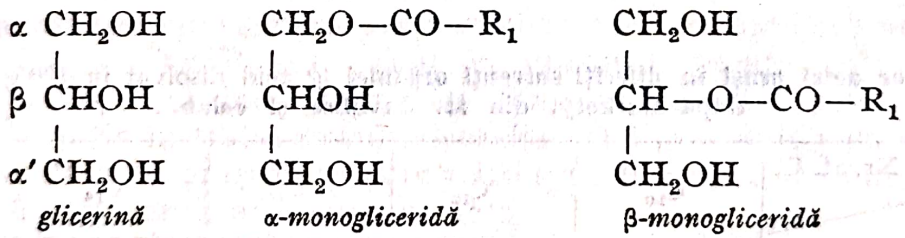
Proprietăți chimice. Dintre proprietățile chimice ale acizilor grași se pot menționa : salefierea grupării carboxilice cu formarea de săpunuri ; esterificarea ; unele reacții caracteristice acizilor grași nesaturați (foarte răspîndiți în grăsimile naturale) ca de exemplu, hidrogenarea, halogenarea (fixarea iodului), izomerizarea, oxidarea, autooxidarea. Unele din aceste proprietăți sînt de mare interes biochimic, servind pentru caracterizarea, în special, a lipidelor (a se vedea 1.2.3.1.1.).

1.2.3. LIPIDELE SIMPLE

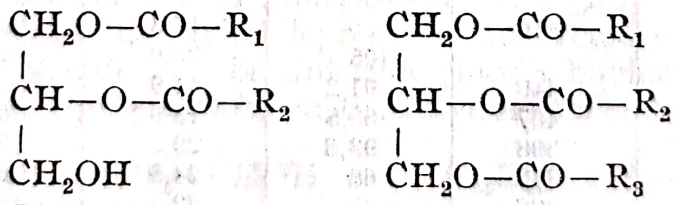
Din grupa grăsimilor simple, formate numai din C, H, O fac parte : gliceridele, ceridele (ceruri), etolidele, steridele (care se vor trata separat în *1.2.5.*), glicolidele, eterii glicerolului și alcoxigliceridele, carotenoceridele.

1.2.3.1. GLICERIDELE

Gliceridele sînt esteri ai glicerolului cu acizii grași. Pentru precizarea pozițiilor se notează convențional cei 3 atomi de C ai glicerinei cu 1, 2, 3 sau cei doi C primari cu α (sau α și α') iar cel de la mijloc cu β. După numărul moleculelor de acizi grași pot apare : monogliceride (MG) și digliceride (DG) numite și gliceride parțiale și trigliceride (TG), conform formulelor de mai jos :



glicerină *α-monogliceridă* *β-monogliceridă*



Digliceridă *Trigliceridă*

Denumirea gliceridelor se face indicînd numele acizilor grași constituenți, urmați de sufixul *-ină*, de exemplu oleo-palmito-stearină ; stearo-dioleină ; tristearină etc.

Grăsimile naturale sînt alcătuite din trigliceride în care acizii grași sînt diferiți. În grăsimile de sinteză, obținute din glicerină cu acizi grași diferiți, repartizarea acestora în molecula TG este absolut la întîmplare ; în grăsimile naturale esterificarea cu un anumit acid gras are loc la întîmplare, dar se respectă o anumită proporție a acizilor grași care să asigure de exemplu fluiditatea lipide-

lor *in vivo*, de unde ipoteza *„repartiţiei la întîmplare, restrînsă" (Kartha)*. Proporţia acizilor graşi din grăsimea umană şi a unor specii de animale este prezentată în *tabelul 1.12*

TABELUL 1.12

Compoziţia în acizi graşi a unor grăsimi animale şi vegetale

ACIZI GRAŞI: / SPECIA:	Saturaţi			Nesaturaţi				
						C_{18}		
	C_{14}	C_{16}	C_{18}	C_{14}	C_{16}	oleic	linoleic	C_{20}*
Om	2,6	24,7	7,7	0,8	7,3	45,8	10,0	1,5
Porc	1,7	25,5	13,7			50,2	8,9	
Bou	3,3	24,9	24,1	0,4	2,4	41,8	1,8	0,5
Pui găină	0,1	25,6	7,0		7,0	38,4	21,3	0,6
Oaie	4,6	24,6	30,5			36,0	4,3	
Şobolan	3,1	26,7	0,4	0,9	15,6	47,2	2,2	0,3
Oleu ficat morun	3,5	10,0		0,5	15,5	25,0		31,5**
Oleu de măsline		9,4	2,0			84,5	4,0	
Oleu de porumb		7,8	3,5			46,3	41,8	

* Acizi graşi cu 20 atomi de carbon, cu diferite grade de nesaturare
** Acizi graşi cu 22 atomi de carbon, nesaturaţi: 14%

1.2.3.1.1. *PROPRIETĂŢI DE INTERES BIOCHIMIC ŞI ÎN ANALIZELE DE LABORATOR*

Hidroliza (saponificarea). Fiind insolubile în apă, trigliceridele sînt relativ rezistente la hidroliză. Aceasta se poate realiza în mediu alcalin, cu formarea săpunurilor; în mediu acid, cu formarea acizilor graşi, şi enzimatic (lipaze). În timpul hidrolizei TG, se detaşează treptat cîte un AG, trecînd succesiv prin fazele de DG şi MG, produsul final fiind glicerina şi acizii graşi ca atare sau sub formă de săpunuri.

Proprietăţile acizilor graşi sînt expresia alcătuirii moleculei lor din două părţi cu caractere distincte: lanţul alifatic apolar şi funcţiunea carboxilică polară; cu cît prima are o pondere mai mare (număr mai mare de atomi de C) cu atît proprietăţile acesteia predomină, concomitent fiind „mascate" unele proprietăţi ale grupei polare.

Prin transformarea în săruri alcaline (săpunuri), ionizarea funcţiei carboxilice devine totală şi creşte caracterul polar al moleculei săpunului, care se orientează cu grupările $-COO^-$ spre apă, în timp ce restul lanţului se îndepărtează de aceasta. La zona de separare a apei de o fază apolară, moleculele de săpun se orientează cu lanţul alifatic spre faza apolară şi tensiunea interfacială scade cu creşterea concentraţiei săpunului (pînă la concentraţia „critică") şi se produce o dispersie mecanică ce măreşte aria interfeţelor; săpunurile se organizează la aceste interfeţe şi stabilizează dispersia fazei apolare (emulsionare); lanţurile

alifatice se asociază între ele în micele, sau cu alte molecule insolubile în apă, formînd micelii mixte ce ajută solubilizarea. Un caz special, de interes biochimic, este al complecşilor *coleinici*, formaţi cu acizii biliari, implicaţi în absorbţia intestinală a lipidelor.

Pentru caracterizarea lipidelor se determină diferiţi *indici* (F.R.IX):

Indice de aciditate: **numărul de mg KOH necesar pentru neutralizarea acizilor graşi liberi dintr-un gram produs (grăsimi, uleiuri, răşini, balsamuri).**

Indice de saponificare: **numărul de mg KOH necesar pentru neutralizarea acizilor graşi liberi şi a acizilor rezultaţi din saponificarea a 1 g produs.**

Indice de ester: **numărul de mg de KOH necesar pentru neutralizarea acizilor graşi rezultaţi din saponificarea a 1 g substanţă; se obţine prin calcul: indice de saponificare minus indice de aciditate.**

Indice de iod: **numărul de g de iod fixat de 100 g produs.**

Indice de peroxid: **numărul de miliechivalenţi oxigen activ din 1.000 g grăsime, ulei gras etc. respectiv numărul de ml de tiosulfat de sodiu 0,001 N oxidaţi de iodul eliberat din HI prin acţiunea peroxizilor din 1 g produs, în condiţiile date (F.R.IX).**

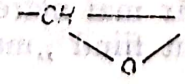
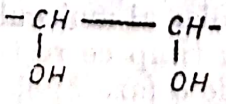
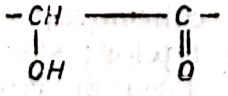
Hidrogenarea. Majoritatea grăsimilor conţinînd A.G. nesaturaţi, dublele legături din aceştia se pot hidrogena în prezenţă de catalizatori (Pt, Pd, Ni redus). Deoarece lipidele sînt cu atît mai lichide (adică au p.t. mai scăzut) cu cît conţin o proporţie mai mare de A.G. nesaturaţi, hidrogenarea conduce la grăsimi din ce în ce mai saturate şi respectiv mai solide. Acest proces stă la baza obţinerii *margarinei* prin hidrogenarea grăsimilor animale sau vegetale; pentru corectarea gustului se poate adăuga gălbenuş de ou, iar pentru asigurarea conţinutului de vitamine, similar cu al untului, se adaugă vitamina A şi D.

La nivelul dublei legături se pot adiţiona halogeni, de exemplu iod, cantitatea fixată crescînd paralel cu gradul de nesaturare.

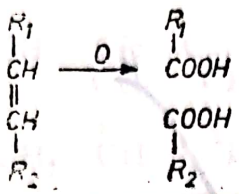
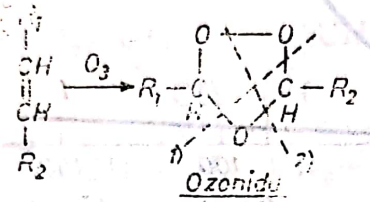
Oxidarea, autooxidarea şi descompunerea termică. Dublele legături din acizii graşi reacţionează foarte uşor, cu formarea unor compuşi diferiţi, după natura agenţilor oxidanţi şi condiţii *(tabelul 1.13)*

TABELUL 1.1

Tipuri de scindare a acizilor graşi la nivelul dublei legături

Tip de reacţii sau de compuşi formaţi	*Formula*	Condiţii de formare
Epoxizi		Cu peracizi organici (de ex. ac. peracetic) în mediu anhidru şi la temperaturi scăzute
Derivaţi *dihidroxilaţi*		Cu aceeaşi peracizi, peste 40° în prezenţă de acizi puternici, sau $KMnO_4$ în sol. alcalină la rece
hidroxicetone		Cu $KMnO_4$ în soluţie neutră

TABELUL 1.13 *(continuare)*

Tip de reacții sau de compuși formați	*Formula*	Condiții de formare
ruperea legăturii *etenice*		Cu oxidanți mai puternici, de ex. $KMnO_4$ alcalin apos conc. sau în soluție acetonică
formarea de *ozonide* și scindarea acestora	 1) $R_1-COOH + R_2-CHO$ 2) $R_1-CHO + R_2-COOH$ $R_1-CHO + R_2-CHO + O$	Reacția utilizează ozonul și servește, prin identificarea produșilor de scindare la stabilirea poziției dublei legături din acidul gras (metoda Harries)

Mecanismul autooxidării (rîncezirii) se explică prin formarea radicalilor liberi, de exemplu, de la acidul oleic, în prezență de oxigen, se pot forma patru ipuri de radicali liberi:

$$CH_3-(CH_2)_6-CH_2-CH=CH-CH_2-(CH_2)_6-COOH \text{ (acid oleic)}$$

$$-\overset{*}{C}H-CH=CH-CH_2 \qquad -CH_2-CH=CH-\overset{*}{C}H-$$

$$-CH=CH-\overset{*}{C}H-CH_2- \qquad -CH_2-\overset{*}{C}H-CH=CH-$$

Autooxidarea (oxidarea spontană) sau *rîncezirea* este un mecanism interesant ce se constată în timpul expunerii grăsimilor la aer și poate fi apreciat prin *indicele de peroxid*. Intensitatea procesului este paralelă cu numărul dublelor legături din A.G., fiind foarte slabă la cei saturați și din ce în ce mai mare, cu creșterea gradului de nesaturare. Cinetica fixării oxigenului corespunde unui proces autocatalitic de „reacție în lanț"; la început fixarea este mai lentă (faza de inducție) apoi se intensifică, sub efectul temperaturii și luminii *(figura 1.26)*

Plecînd de la dubla legătură, în prezența unui prooxidant (de exemplu, urme de metal) se produce o reacție în lanț, prin radicalii liberi, către unul din carbonii adiacenți dublei legături. Prin propagarea reacției într-o parte sau alta a dublei legături vor rezulta peroxiradicali și hidroperoxizi, ei înșiși, oxidanți. Hidroperoxizii sînt instabili și se descompun ușor dînd un amestec de acizi, aldehide, cetone, alcooli; compușii rezultați poartă adesea două funcțiuni (de exemplu acizi-

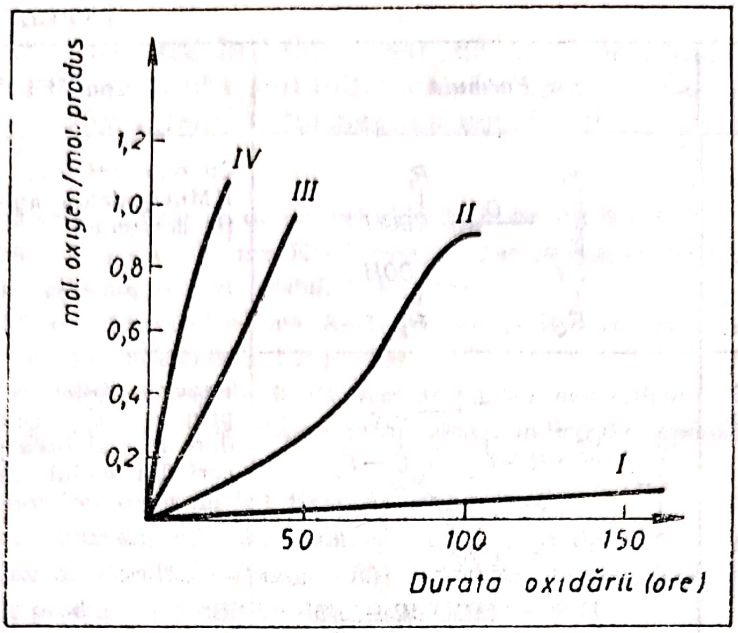


Fig. 1.26. Cinetica autooxidării unor esteri metilici ai acizilor graşi.
I. Oleat de metil: 1 dublă legătură. II. Linoleat de metil: 2 duble legături III. Linolenat de metil: 3 duble legături. IV. Arachidonat de metil: 4 duble legături.

-alcooli, acizi-aldehide etc.). Formarea peroxiradicalilor şi hidroxiperoxizilor este ilustrată prin următoarea secvenţă de reacţii:

$$-\overset{*}{C}H-CH=CH-CH_2 + O_2 \rightarrow -\underset{\underset{O-\overset{*}{O}}{|}}{CH}-CH=CH-CH_2-$$

(peroxiradical)

$$-\underset{\underset{O-\overset{*}{O}}{|}}{CH}-CH=CH-CH_2- + -CH_2-CH=CH- \rightarrow -\underset{\underset{O-OH}{|}}{CH}-CH=CH-CH_2- + -\overset{*}{C}H-CH=CH-$$

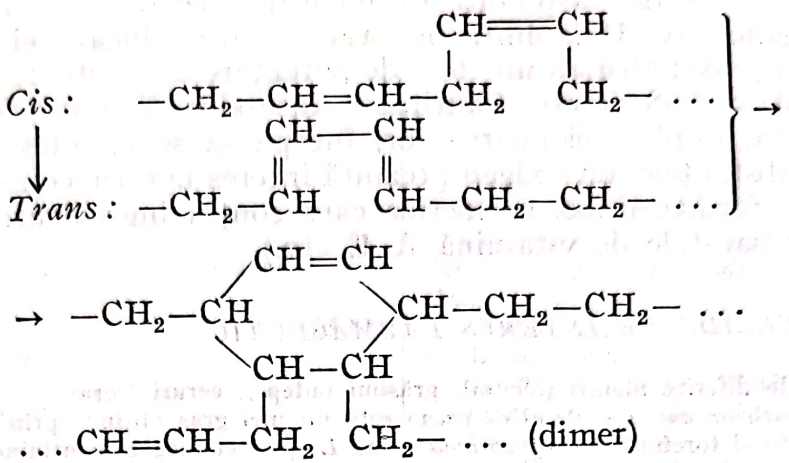
Grăsimile neutre, în special emulsionate (unt, brînzeturi, margarină) pot să sufere, *sub acţiunea microorganismelor*, un alt tip de rîncezire, cu eliberarea de acizi graşi (cînd aceştia sînt solubili dau alimentelor un gust de săpun) şi procese de oxidare ale acizilor graşi, cu formarea de acizi β-cetonici, care, prin decarboxilare, dau metil-cetone, dintre care cele cu 8—10 atomi de C au gust şi miros caracteristic neplăcut, după următoarele reacţii:

$$R-CH_2-CH_2-COOH \xrightarrow{+O} R-CO-CH_2-COOH \xrightarrow{-CO_2} R-CO-CH_3$$

Uleiurile *sicative* nu rîncezesc; prin oxidare, moleculele lor cresc în greutate şi devin răşinoase, datorită polimerizării peroxizilor acizilor graşi componenţi. Uleiurile care conţin acizi graşi cu duble legături neconjugate (de exemplu, ac. linolenic) sînt sicative, iar cele cu două legături etenice (linoleic), semisicative. Uleiul de in, care conţine acid linoleic (42,6%) şi linolenic (38,1%) este folosit în vopsitorie şi pictură; macromoleculele formate protejează materialele pe care se depun (lemn, metale, pînză etc.).

Scanned with OKEN Scanner

În timpul coacerii sau frigerii alimentelor lipidice, pe lîngă oxidări, pot avea loc și procese de polimerizare:



Inițial, din forma cis-1,4-dien se trece în forma stabilă trans-1,3-dien (cu duble legături conjugate), apoi acidul gras inițial adiționează forma stabilă dînd un dimer. Atît forma monomeră cît și dimerii, pot prezenta toxicitate; în plus, prin contactul cu aerul și sub influența temperaturii și a agenților catalitici din vasele utilizate, degradarea este mai profundă, conducînd la compuși cancerigeni.

Efectul antioxigen. Antioxidanți. Urmărind cinetica autooxidării unui ulei vegetal natural și a esterilor metilici obținuți de la acest ulei se constată că produsul natural nu fixează practic oxigenul în primele ore (sau chiar zile) pentru a ajunge la un moment în care fixarea se face foarte rapid, similar cu cazul esterilor metilici; cele două curbe sînt distanțate în timp, dar paralele și de aceeași intensitate maximă *(figura 1.27)*

Retardarea atingerii momentului de oxidare puternică se datorește prezenței în grăsimile naturale a unor produși „antioxigen", care formează compuși stabili

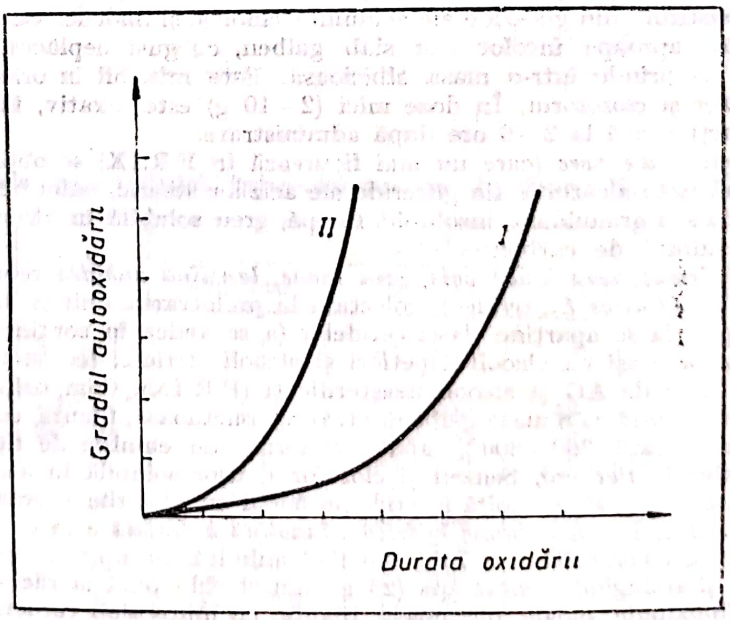


Fig. 1.27. Cinetica oxidării unui ulei vegetal (I) și a esterilor săi metilici (II) (după Javillier și colab.).

cu radicalii hidroxiperoxizi liberi (R—COO*), împiedicînd astfel autooxidarea. Asemenea produși antioxigen sînt polifenolii și, în special tocoferolii (vitamina E), care se găsesc destul de răspîndiți în uleiurile vegetale, apoi hidrochinona, esterii acizilor galici etc. Unii dintre aceștia se autooxidează ei înșiși și protejează astfel acizii grași; alții au un efect de potențare al acestora, ca de exemplu, acidul tartric, citric, fosforic etc. Cantitatea antioxidanților din produsele naturale fiind limitată, după consumarea lor, începe să se manifeste autooxidarea acizilor grași. Substanțele antioxigen prezintă interes pentru conservarea produselor alimentare, farmaceutice, cosmetice care conțin ingrediente autooxidabile (de exemplu, preparatele de vitamină A, E etc.).

1.2.3.1.2. *GLICERIDE DE INTERES FARMACEUTIC*

F.R.IX prevede diferite uleiuri (oleum), grăsimi (adeps), ceruri (cera).

Oleum cacao, butirum cacao sau *unt de cacao* este un ulei gras obținut prin presarea la cald a semințelor decorticate și torefiate de *Theobroma cacao L.* (Sterculiaceae) conținînd gliceride ale acizilor palmitic, stearic, oleic și cantități mici de A.G. liberi. Se prezintă sub forma unor plăci sau fragmente neregulate, gălbui, cu miros de cacao și gust plăcut. Este practic insolubil în apă, puțin solubil în alcool etilic (la rece) și solubil în alcool etilic (la cald), benzen, eter de petrol, cloroform, eter, sulfură de carbon.

Oleum helianthi, ulei de floarea-soarelui, obținut din semințele de *Helianthus annuus L.* (Compositeae) prin presare la rece. Este alcătuit din gliceride ale acidului oleic și linoleic și se prezintă ca un ulei galben-deschis, cu miros slab caracteristic și gust dulceag. Este greu solubil în apă și alcool, dar miscibil în orice proporție cu eterul, cloroformul, benzina, uleiul de terebentină. *Oleum helianthi neutralisatum* se obține prin neutralizarea precedentului cu Na_2CO_3 și servește ca vehicul în unele forme injectabile, fiind în prealabil sterilizat la 180° timp de 20 minute.

Oleum jecoris, untura (uleiul) de pește este un ulei gras purificat prin răcire la 0°, obținut din ficatul proaspăt sau conservat al peștelui *Gadus morrhua L.* sau alte specii de gadidee. Se prezintă ca un lichid de culoare galben deschis, cu miros și gust de pește, greu solubil în alcool, ușor solubil în eter, cloroform. Prezintă importanță datorită conținutului ridicat în vitamine A și D.

Oleum lini, uleiul de in, se obține prin presarea la rece a semințelor de *Linum usitatissimum L.* (Linaceae). Este format din gliceride ale acidului linolic și linolenic și se prezintă ca un ulei de culoare galbenă, sicativ, cu miros caracteristic, greu solubil în alcool, miscibil în orice proporție cu eter, cloroform, benzină, ulei de terebentină.

Oleum ricini, ulei de ricin, obținut din semințele de *Ricinus communis L.* (Euphorbiaceae) prin presare la rece, este constituit din gliceride ale acidului ricinoleic și linoleic. Se prezintă ca un lichid uleios, limpede, vîscos, aproape incolor sau slab galben, cu gust neplăcut. Prin răcire la 0° se tulbură, iar la —16° se prinde într-o masă albicioasă. Este miscibil în orice proporție cu alcool absolut, acid acetic, eter și cloroform. În doze mici (2—10 g) este laxativ, iar în doze mari (15—40 g) este purgativ; acționează la 2—6 ore după administrare.

Adeps suillus, untura de porc (care nu mai figurează în F.R.IX) se obține prin topirea țesutului adipos al porcului. Este alcătuită din gliceride ale acizilor stearic, palmitic, oleic și se prezintă ca o masă albă omogenă sau granuloasă, insolubilă în apă, greu solubilă în alcool, ușor în cloroform, eter, eter de petrol, sulfură de carbon.

Adeps lanae anhydricus, cera lanae ovis, cera lanae, lanolina anhidră reprezintă secreția glandelor sebacee ale oilor (*Ovis aries L.*, ovidee), colectată la prelucrarea lînii și preparată prin spălare și extracție. Prin compoziția sa aparține clasei ceridelor (a se vedea în continuare) fiind constituită din 95% esteri ai acizilor grași cu alcooli superiori și alcooli steridici (colesterol, oxicolesterol, izocolesterol) și cantități mici de AG și alcooli neesterificați (F.R.IX). Compoziția mai completă este dată în *tabelul 1.14.* Se prezintă ca o masă galbenă vîscoasă, onctuoasă, filantă, cu miros caracteristic. Lanolina anhidră încorporează 200—300% apă sub formă de emulsie de tipul A/U. Este foarte solubilă în alcool absolut la fierbere, benzen și cloroform, ușor solubilă în acetat de etil, acetonă, eter, eter de petrol, miscibilă în stare topită în orice proporții cu uleiurile vegetale și uleiul de parafină, practic insolubilă în apă. *Adeps lanae hydricus, lanolina hidratată* este o emulsie de tipul A/U în care faza externă este constituită din 75% lanolină anhidră. Se obține topind lanolina anhidră (75 g) pe baie de apă și adăugînd treptat apa (25 g), amestecînd pînă la răcire și omogenizare. Se prezintă ca o masă alb-gălbuie, moale, onctuoasă, filantă, cu miros slab caracteristic.

În *tabelul 1.15* se prezintă caracteristicile fizico-chimice ale lipidelor înscrise în F.R. IX (respectiv VIII).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.14

Compoziția globală a lanolinei (F. Fawaz. F. Puisieux, 1972)

HIDROCARBURI (HC)	0,6%	*ACIZI* (Ac)	43,8%
— 42 HC normale C_9—C_{50} . .	0,1%	*Acizi liberi* (saturați nonhidroxilați)	0,5%
— 32 HC puțin ramificate (Seria II: C_{16}—C_{48})	. .0,04%	— 21 ac. normali C_8—C_{44}	0,2%
— 32 HC puțin ramificate (Seria III: C_{16}—C_{48})		— 18 ac. izo C_{12}—C_{44}	0,1%
		— 17 ac. anteizo C_{13}—C_{45}	0,2%
— HC foarte ramificate . .	0,46%	*Acizi combinați* (nonhidroxilați)	
ALCOOLI.	55,6%	— *saturați*	26,2%
Monoalcooli alifatici (1-alcanoli)	9,5%	— 27 ac. norm. C_8—C_{38}	5,5%
— 16 alc. normali C_{14}—C_{35}.	0,9%	— 17 ac. izo C_8—C_{40}	9,5%
— 12 alc. izo C_{14}—C_{36}	3,6%	— 18 ac. anteizo C_7—C_{41}	11,2%
— 10 alc. anteizo C_{17}—C_{33}.	5%	— *nesaturați* (monoetilenici)	0,9%
1,2-Alcandioli alifatici	4,8%	— 17 ac. norm. C_{13}—C_{29}	0,7%
— 12 alcandioli 1,2-normali C_{12}—C_{24}	0,2%	— 15 ac. izo C_{12}—C_{40}	0,1%
— 10 alcandioli izo C_{12}—C_{30}	3,2%	— 14 ac. anteizo C_{13}—C_{39}	0,1%
— 9 alcdioli anteizo C_{13}—C_{29}.	1,4%	*Acizi combinați* (hidroxilați)	
Steroli	23,2%	— *α-hidroxilați*	11,8%
— 7 cetocholesta-3,5-diene	2%	— 23 ac. norm. C_{10}—C_{32}	9,5%
— Colesterol	21,2%	— 12 ac. izo C_{12}—C_{34}	2%
— Dihidrocolesterol	urme	— 12 ac. anteizo C_{11}—C_{33}	0,3%
Alcooli triterpenici	14,8%	— ω-hidroxilați	2,3%
— Lanosterol	8,2%	— 14 ac. norm. C_{22}—C_{36}	1,3%
— Dihidrolanosterol .	5,7%	— 8 ac. izo C_{22}—C_{36}	0,4%
— 3β-hidroxi-7-ceto-lanosta-8-en . . .	0,9%	— 7 acizi anteizo C_{23}—C_{35}	0,6%
Polioli nedeterminați	3,3%	*Acizi polihidroxilați*	2,1%

TABELUL 1.15

Unele caracteristici fizico-chimice ale lipidelor din F.R.IX

PRODUSUL	p.t.	Indice				Densitate (d^{20})
		aciditate	saponif.	iod	perox.	
Adeps lanae anhidr.	36—42°	<1	94—106	18—32	<6	
Adeps suillus (F.R. VIII)	34—46°	<2	193—200	46—66		
Oleum cacao	30—35°	<2,25	188—200	32—38		
Oleum helianthi		<3	185—198	119—136	<15	0,917—0,930
Idem, neutralisatum		<0,25	idem	idem		
Oleum jecoris		<2	180—196	150—175		0,918—0,928
Oleum lini		<4	184—195	167—200		0,925—0,936
Cera alba	62—66°	17,5—23,0	83—106		<10	0,956—0,970
Cera flava	62—65°	17—20,5	83—100		<5	0,950—0,965
Cetaceum		<2	114—132	<8	<8	0,940—0,955
Oleum ricini		<3	176—186	80—88		0,956—0,966

Scanned with OKEN Scanner

1.2.3.2. CERIDE

Ceridele (ceruri) sînt lipide simple în care un alcool cu gr. mol. mare (alcool „gras") se esterifică cu un acid gras. În sens mai larg această grupă cuprinde pe lîngă *ceridele propriu-zise* şi *steridele (1.2.5), caroteno-ceridele, etolidele* (cu acizi-alcooli), *glicolidele, alcoxigliceridele* etc.

Ceridele propriu-zise corespund formulei generale: $R-(CH_2)_n-CO-O-(CH_2)_m-CH_3$; după saponificarea ceridelor apar numai acizi graşi insolubili în apă (spre deosebire de gliceride) care pot fi extraşi cu solvenţi organici (eter). Principalii acizi din compoziţia ceridelor sînt: cerotic: $CH_3-(CH_2)_{24}-COOH$; laceroic: $CH_3-(CH_2)_{30}-COOH$; melisic: $CH_3-(CH_2)_{28}-COOH$; carnaubic: C_{24} cu un metil lateral, şi principalii alcooli, cei cu număr de atomi de C corespunzători conform formulei: $CH_3-(CH_2)_m-CH_2OH$ în care m = 14: alcoolul cetilic; m = 24: cerilic; m = 28: miricilic (melisic); m = 30: lacerilic.

Compoziţia unor ceruri este dată în tabelul 1.16

TABELUL 1.16

Compoziţia unor ceruri (după J. E. Courtois, R. Perles)

Ceară galbenă de albine		*Cetaceum* (spermanţet, alb de balenă)	
Esteri ai acizilor ceroşi, total	71%	*Esteri ai acizilor graşi*	98%
din care:		din care:	
palmitat de miricil	23%	palmitat de cetil	92%
palmitat de laceril	2%	stearat, oleat şi palmitoleat de cetil	6%
ceroat de miricil	12%		
hipogeat de miricil	12%		
hidroxipalmitat de ceril	9%	*Palmitat de colesteril*	2%
esteri acizi şi poliesteri	13%	*Acizi liberi*	
Acizi liberi	14%	*Alcooli liberi*	
Alcooli liberi	1,5%		
Hidrocarburi	10—13%		

Ceridele sînt răspîndite atît în regnul vegetal (în cuticula frunzelor şi florilor şi sub formă de rezervă în unele seminţe), cît şi în secreţiile insectelor (albine) şi la animalele marine şi oceanice (crustacee, balenă, caşalot etc.).

De interes farmaceutic (F.R.IX) sînt următoarele:

Cera flava, ceară galbenă, produsul prelucrat de albine (Apis mellifica, apideae), obţinut prin topirea în apă caldă a fagurilor de albine, după golirea de miere. Conţine 70—75% esteri ai alcoolilor superiori (C_{26-32}) cu acizii palmitic, hidroxipalmitic, dehidropalmitic şi cerotic (complex denumit „miricină"), 14% acizi graşi liberi, 12% hidrocarburi corespunzătoare alcoolilor de ceară şi cantităţi mici de alcooli liberi şi sitosterină. Se prezintă ca o masă galbenă, plăci sau turte, cu fractură mată şi granuloasă, cu miros slab caracteristic similar mierii. Este uşor solubilă în benzen, cloroform şi uleiuri eterice; solubilă în eter la cald; parţial solubilă în alcool la fierbere; practic insolubilă în apă şi alcool; miscibilă în stare topită cu vaselina, parafina şi uleiurile fixe.

Scanned with OKEN Scanner

Cera alba, ceara albă, obținută prin purificarea și înălbirea la soare sau cu peroxizi a cerei galbene.

Cetaceum, spermanțet, ceară cristalină purificată, provenind din cavitățile craniene și pericraniene ale caşalotului *Physeter macrocephalus L.* sau *Physeter catodon L.* Se prezintă ca solzi sau masă albă cu aspect cristalin și structură lamelară. Este ușor solubil în cloroform, eter, eter de petrol, sulfură de carbon; solubil la fierbere în alcool, practic insolubil în apă; în stare topită este miscibil cu uleiurile fixe și volatile.

Etolide sau estolide

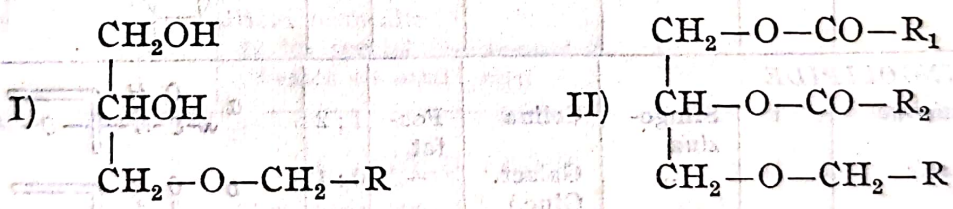
Sînt lipide simple prezente în cerurile coniferelor, alcătuite numai din *acizi-alcooli* de tipul: $HO-CH_2-(CH_2)_n-COOH$, ca de exemplu acidul *juniperic* (n = 14) și acidul *sabinic* (n = 10) din ceara de *Juniperus sabina*. Legarea se face după tipul: $HO-CH_2-(CH_2)_n-CO-O-CH_2)-(CH_2)_n-CO-O\ldots$ Numărul moleculelor de acid-alcooli din etolidele naturale este variabil, ajungînd pînă la produși cu gr.mol. peste 2.000.

Glicolide și glicoceride

Sînt alcătuite din esteri ai acizilor grași cu polialcooli, oze sau ozide, ca de exemplu cu manozido-1-eritrol, din uleiurile unor ciuperci; lipogalactozide ca de exemplu, β-D-galactozido-1-glicerol și α-D-galactozido-1,6-β-D-galactozido—1--glicerol din fracțiunea lipidică a făinii de grîu; 6,6′-dimicolatul de trehaloză, lipidă toxică izolată din *Mycobacterium tuberculosis*.

Eteri ai gliceridelor și alcoxigliceride

Din lipidele animale au fost izolați compuși în care alcoolii „grași" se eterifică cu glicerolul (formula I) și alcoxidigliceride, respectiv diglicero-monoglice-roxizi (formula II):



Nu se cunoaște rolul lor biologic, dar s-a observat că apar în grăsimile anormal de puțin nesaturate (*J. Lovern*, 1937). Tendința marcată la saturare se manifestă atît prin reducerea funcțiunii $-COOH$ la $-CH_2OH$, cît și prin gradul redus de nesaturare al A.G. (R_1, R_2)

Carotenoceride

Fac parte din lipidele colorate, alcătuite din acizi grași incolori cu alcooli colorați (*L. Zechmeister, L. V. Cholnovsky*, 1930). Din grupul acestor cromolipide fac parte carotenoceridele care conțin carotenoide alcoolice (xantofile), de ex. *physaliena* (ester dipalmitic al zeaxantinei) sau capsantina din ardeiul roșu.

Vitamina A, care este un alcool derivat din caroteni, apare atît liberă cît și esterificată cu diferiți acizi grași, dar acești compuși sînt incolori (a se vedea *Vitamine*: 2.1.2.1).

În *figura 1.28* se prezintă o schemă cu clasificarea și structura lipidelor simple și complexe.

Scanned with OKEN Scanner

GRUPA, Clasa	Nr. AC. GR.	Compon. alcool	Baze-N Oze	Fosf. alţi aci zi	P: N	STRUCTURA
I. *GRĂSIMI SIMPLE*						
a. *Ceruri*	1	alif. (C_{16-34})	—	—	—	a
b. *Steride*	1	aliciclic (steroli)	—	—	—	b
c. *Trigliceride* (grăs. neutre)	3	glicerina	—	—		c
II. *GLICERIN-FOSFATIDE*						
a. Ac. *fosfatidici*	2	Glicerina	—	Fos-fat	1 :0	a
b. *Lecitine*	2	,,	Colina	,,	1 :1	
c. *Cefaline*	2	,,	Colamina	,,	1 :1	
d. *Fosfatidil serine*	2	,,	Serina	,,	1 : 1	b, c, d
e. *Plasmalogeni* * aldeh. Ac. gr. enoleter gr.	2*	,,	Colina, Colamina	,,	1 : 1	e
f. *Fosfatidil-inozite*	2	,,	inozitol	,,	1 : 0	f
III. *SFINGOLIPIDE*						
a. *Sfingomieline*	1	Sfingo-zina	Colina	Fos-fat	1 : 2	a
b. *Cerebrozide*	1	,,	Galact. Gluc.)	—	0 : 1	b
c. *Gangliozide*	1	,,	Hexoz-amine, Ac. neu-raminic	—		c. structuri mai complicate
d. *Sulfatide*	1	,,	Galact.	Sul-fat		d

Structura α-lecitinei

Glicerina

(N): Colina, Colamina

Ac. graşi

Sfingozina (sphing-4-enina)

Fig. 1.28. Clasificarea şi structura lipidelor

1.2.4. LIPIDE COMPLEXE

În compoziția lipidelor complexe intră, pe lîngă C, H, O, și N sau P (sau ambii) și eventual S. Ele cuprind două grupe mari: *fosfogliceridele* (glicerofosfatide sau fosfatide) și *sfingolipidele*, după natura componentei alcoolice: glicerina sau sfingozina; în ultima grupă se încadrează și lipidele cu sulf.

Pentru clasificarea (gruparea) lipidelor complexe se obișnuiește să se ia în considerare două componente: *componenta I*, care cuprinde alcoolul (cu acid fosforic și acizi grași, dacă este cazul) și *componenta II*, care se referă la ceilalți substituenți, care le diferențiază *(tabelul 1.17)*

TABELUL 1.17

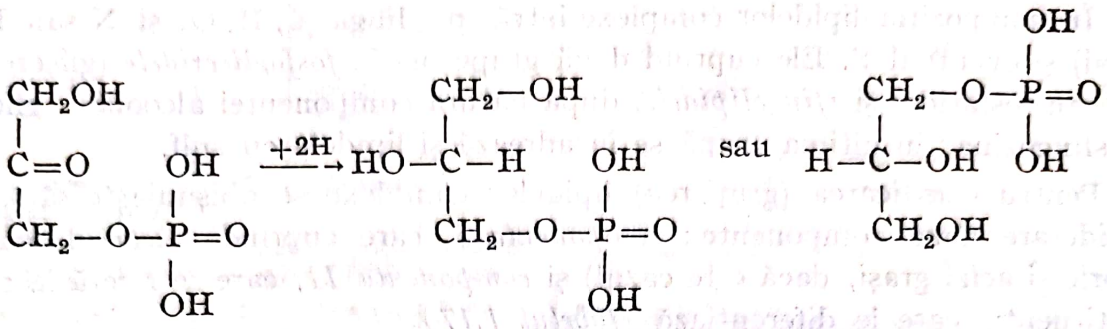
Tipuri de lipide complexe și componentele lor

Produși	Componenta I	Componenta a II-a
	I. *GLICERINFOSFATIDE (FOSFATIDE)*	
Lecitine	Acid fosfatidic	Colina
Cefaline	,, ,,	Colamină sau serină
Cardiolipide	Acizi fosfatidici	Glicerină
Inozitfosfatide	Acid fosfatidic	Inozitol (mioinozita)
Plasmalogeni	Acid fosfatidic de tip special (α-eter-enol și β-ester cu acizi grași)	
	II. *SFINGOLIPIDE*	
Sfingomieline	N-acilsfingozină (P)	Colină
Cerebrozide	N-acilsfingozină	Galactoză
Glucocerebrozide	,,	Glucoză
Sulfatide	,,	Galactoză-6-sulfat
Gangliozide	,,	Hexoze, hexozamine, acid neuraminic acetilat (acid sialic)

1.2.4.1. FOSFOGLICERIDE (glicerofosfatide, fosfatide)

Componenta specifică a acestei clase este *acidul glicerofosforic:* L-α-glicerofosforic sau D-glicerol-1(P), echivalent cu L-glicerol-3-(P). Dacă se dorește să se arate și izomeria acestora se notează cu prefixul *sn-*. Echivalentul numirilor de mai sus este în acest caz sn-glycerol-3 (dehidrogen-fosfat) sau sn-glycero-3--fosforic acidul.

Acidul L-α-glicerofosforic poate lua naştere în organism prin reducerea dihidroxiaceton-(P) (DOAP) care apare în cantitate suficientă în metabolizarea glucozei pe diferite căi :

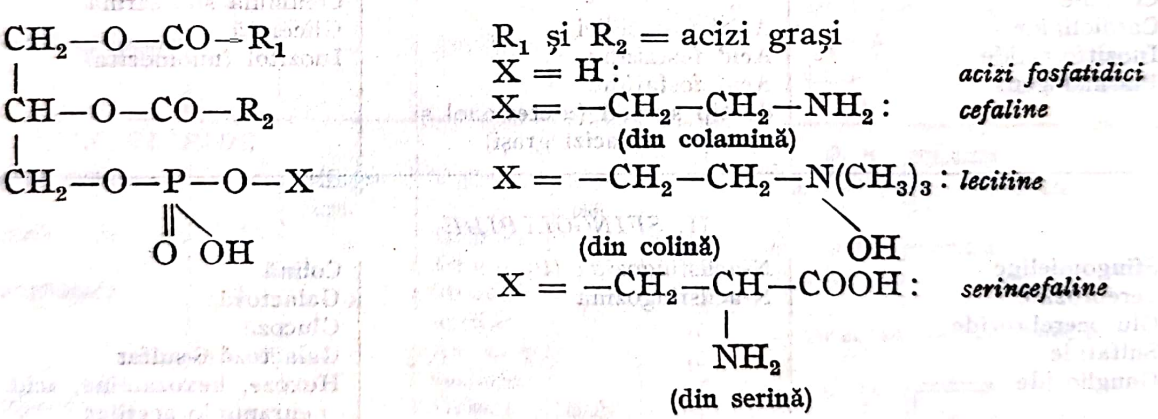


Ac. dihidroxi-aceton-fosforic (DOAP) *Acid L-α-glicerofosforic*

Termenul de *fosfogliceride* este consacrat derivaţilor acidului glicerofosforic care au cel puţin o grupare O-acil, O-alchil sau O-alk-1'-en-1'-il ataşată la restul de glicerol.

Acizii fosfatidici reprezintă derivaţii acidului glicerofosforic în care ambele grupări hidroxilice (rămase după esterificarea cu acid fosforic) sînt esterificate cu acizi graşi. Ei au fost găsiţi în plante şi, cel puţin ca intermediari, la animale.

Lecitine şi cefaline. Prin esterificarea acidului fosfatidic (la nivelul unui oxidril al acidului fosforic) cu *colamina* (etanolamina) se obţin *cefalinele ;* cu *colină* se obţin *lecitinele,* a căror denumire corectă este 3-*sn*-fosfatidil-colina sau 1,2--diacil-sn-glicero-3-fosforilcolina ; cu serina, *serin-fosfatidele* (cefaline) :



Acizii graşi sînt, în majoritate : palmitic, stearic, oleic şi în cantitate mai mică cei cu 20 şi 22 atomi de carbon, saturaţi sau nesaturaţi.

În mod general, R_1 reprezintă un acid gras saturat şi R_2 un acid gras nesaturat, dar există şi excepţii, de exemplu, în lipidele din *Saccharomyces cerevisiae* (drojdia-de-bere) în care ambii acizi graşi pot fi nesaturaţi. Cînd unul din acizii graşi este nesaturat, acesta va ocupa poziţia β(R_2) atît în gliceride cît şi în glicerofosfatide *(Kennedy).*

Glicerofosfatidele se găsesc în cantităţi mari în ţesutul nervos şi gălbenuşul de ou, predominînd de obiceiu lecitinele ; separarea de alte fosfolipide se face pe baza solubilităţii mai mici a cefalinelor în alcool şi în special prin insolubilitatea sărurilor de Cd.

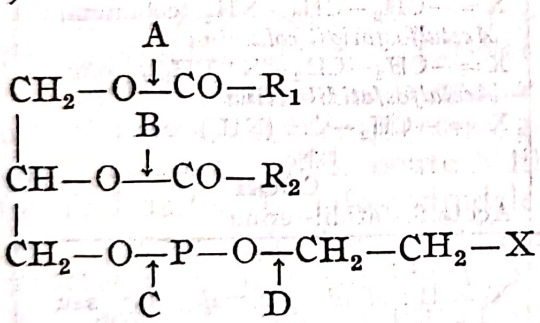
Pentru *prepararea lecitinei* se pot folosi metode variate. Astfel, de exemplu, se pleacă de la extractul lipidic; prin precipitare cu acetonă se separă fosfolipidele, mai ales în prezenţă de $MgCl_2$. În continuare, se solvă lecitinele în alcool şi se purifică sub formă de complex cloro-cadmic, care precipită în soluţie cloroformică, prin adăugare de etanol. Complexul se suspendă în eter de petrol, se spală cu etanol 80% şi se disociază în soluţie cloroformică prin spălări repetate cu alcool 30%. *(M. Pangborn, 1941, 1949, 1951)*. O sursă bună pentru obţinerea lecitinei este gălbenuşul de ou care se usucă la aer cald, se pulverizează în mojar cu 10 p alcool absolut şi extractul alcoolic se tratează cu soluţie alcoolică saturată cu $CdCl_2$ pînă la formarea unui precipitat care se spală cu alcool şi apoi se acoperă cu aproximativ 15 p eter, cu care se malaxează. Se centrifughează, se îndepărtează soluţia eterică (ce conţine derivatul de Cd al cefalinelor) iar precipitatul brun ce conţine lecitina se spală cu eter. În continuare, acesta se extrage la fierbere (refrigerent ascendent) cu 8 p a greutăţii sale alcool 80%, adăugîndu-se, treptat, soluţie concentrată de carbonat de amoniu, care precipită Cd sub formă de carbonat (adăugarea se opreşte cînd mediul devine alcalin). Se filtrează la cald şi se distilă alcoolul. Rezidiul se solvă în cantitatea minimă necesară de eter şi se precipită cu un exces de acetonă. Purificarea se face prin emulsionare cu apă, în prezenţa a I—II pic. soluţie NaCl şi se precipită cu acetonă (1/4—1/3 din volum). Operaţiile se pot repeta de mai multe ori, produsul final uscîndu-se la vid în exicator cu acid sulfuric *(Mac Lean)*.

Metodele actuale permit o purificare avansată a lecitinelor prin cromatografie pe coloană de celuloză (pentru îndepărtarea impurităţilor azotate nelipidice), urmată de cromatografia pe alumină (care reţine cefalinele) şi apoi pe acid silicic (pentru separarea eventualelor lizofosfatide şi sfingolipide) *(C. H. Lea, D. N. Rhodes, R. D. Stoll, 1955, 1957)*.

Pentru obţinerea lecitinelor saturate, soluţiile de ovolecitină în alcool pot fi hidrogenate catalitic (negru de Pt sau Cd coloidal).

Dozarea lecitinelor se poate face prin determinarea colinei uşor hidrolizabile (cu KOH 0,1 N a 37°C timp de 16 ore), sau din preparatele pure, prin dozarea P_i (după hidroliză).

Hidroliza legăturilor esterice poate fi efectuată enzimatic prin fosfolipaze sau lecitinaze. Asemenea enzime se găsesc în veninul şerpilor, bacterii, pancreas, ţesutul nervos etc. şi desfac specific legăturile esterice:



$R_1—CO—$, $R_2—CO—$ = resturi de acizi graşi
$X = —NH_2$: cefaline
$X = —N(CH_3)_3$: lecitine

Fosfolipazele A (care scindează legătura A) se găsesc în veninul de albine şi şerpi şi detaşează un acid gras, producînd derivaţi *„lizo-"* (lizocitine, lizocefaline) cu acţiune hemolitică. *Fosfolipazele B* acţionează după cele A, deci asupra lizolecitinelor sau bizocefalinelor pe care le scindează şi înlătură astfel efectul lor hemolizant. *Lecitinaza C* a fost găsită în bacteria gangrenei gazoase, iar cele de *tip D*, în plante. În pancreas s-au găsit fosfolipaze A şi B, iar în ţesutul nervos fosfolipaze ce scindează produşii obţinuţi prin efectul fosfolipazelor A şi B. În ficat şi creier există şi *GPC-diesteraze* (GPC = glicerol-fosforil-colina). În schema alăturată se prezintă degradarea lecitinei în etape:

$$\text{LECITINA} \xrightarrow[\searrow \text{AG}]{\textit{Fosfolipaza A}} \text{LIZOLECITINA} \xrightarrow[\searrow \text{AG}]{\textit{Fosfolipaza B}} \text{GPC} \xrightarrow[\searrow \text{Colina}]{\textit{GPC-diesteraza}}$$

$$\text{GP} \xrightarrow[\searrow P_i]{\textit{Fosfo-monoesteraza}} \text{G}$$

(unde: AG = acid gras, G = glicerol, P_i = fosfat anorganic, GPC = glicerofosforilcolina, GP = acidul fosfogliceric).

Scanned with OKEN Scanner

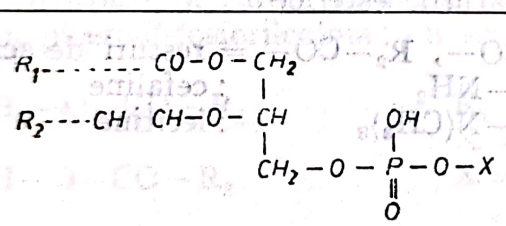
Cercetările recente indică o altă cale de hidroliză:

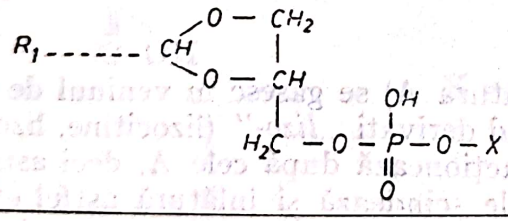
$$\text{LECITINA} \begin{array}{l} \nearrow^{2}\ \alpha\text{-lizolecitina}\ \searrow^{3} \\ \xrightarrow{\qquad\qquad 5} \\ \searrow_{1}\ \beta\text{-lizolecitina}\ \nearrow_{4} \end{array} \text{GLICERO-FOSFORILCOLINA}$$

Enzimele (1—5) implicate în cele 5 căi de hidroliză au fost obţinute din diferite surse.

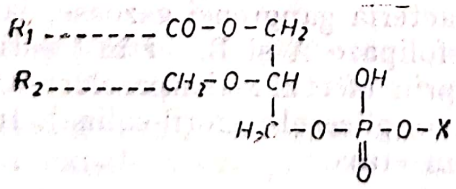
Acetalfosfatide. Această grupă de fosfolipide a fost pusă în evidenţă de către *R. Feulghen* şi *K. Voit* (1924) prin metode histologice, pe baza observaţiei că din grupul fosfolipidelor (extrase prin solvenţi organici) apare, după hidroliza cu HCl, un compus aldehidic, plasmalul, capabil să reoxideze reactivul *Schiff* (fuxina bisulfitată). Izolarea s-a realizat mai tîrziu prin tehnica *distribuţiei în contra curent (Klenk, Debuch, 1945—1955)*. Glicerina din molecula acestora se poate lega prin unul sau 2 oxidrili cu un acid gras şi o aldehidă „grasă" (de obicei aldehida corespunzătoare acidului palmitic, palmitaldehida enolizată; cu o aldehidă „grasă" legată la doi oxidrili ai glicerinei; un eteroxid obţinut în special prin hidrogenare artificială), cu alcooli „graşi" (eteri) etc. O grupare OH a glicerinei este esterificată cu acidul fosforic, care la rîndul lui poate lega colamina şi în măsură mai mică serina sau colina. În *figura 1.29* se prezintă cîteva tipuri de acetalfosfatide.

În general, acetalfosfatidele se găsesc în cantitate de 1—10% în fosfolipidele tisulare animale: *fosfatidilcolamina* (creier), *acetal-fosfatidilcolina* (ţesutul cardiac); acetal-fosfatidilserina (ţesutul nervos). *Eterfosfatidele* (alcoxifosfatidele) nu





Structura	Denumirea
R_1 ------ $CO-O-CH_2$ R_2 ---- CH $CH-O-CH$ OH $CH_2-O-P-O-X$ O	$X=-CH_2-CH_2-NH_2$ (colamina): *Acetalfosfatidil-colamina* $X=-CH_2-CH_2-N^+(CH_3)_3$ (colina) *Acetalfosfatidil-colina* $X=-CH_2-CH(NH_2)$ (serina): $COOH$ Acetalfosfatidil-serina
R_1 ------ CH $O-CH_2$ / $O-CH$ $H_2C-O-P-O-X$ (OH, O)	$X=H$: *Acid plasmalogenic* sau *Acetallizofosfatidic* $X=-CH_2-CH_2-NH_2$: *Plasmalogenilcolamina*
R_1 ------- $CO-O-CH_2$ R_2 ------- CH_2-O-CH OH $H_2C-O-P-O-X$ O	$X=-CH_2-CH_2-NH_2$ *Eter fosfatidilcolină* sau Alcoxifosfatidă
R_1 ------- CH_2-O-CH_2 $CHOH$ OH $H_2C-O-P-O-H$ O	*Acid batilfosforic* sau *Eter lizofosfatidic*



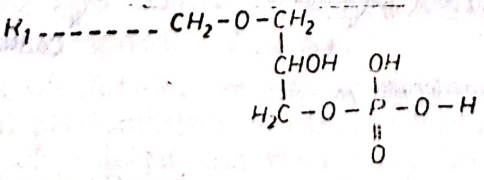
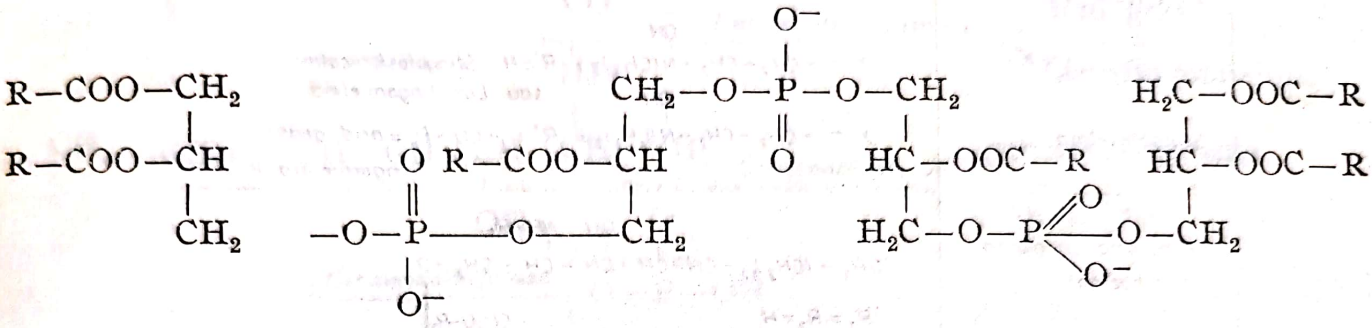


Fig. 1.29. Structura şi denumirea unor acetalfosfatide şi a unor compuşi înrudiţi

s-au găsit în produșii naturali, dar *alcoolul batilic* (component al acestora) a fost identificat în unele țesuturi animale și în pereții arteriali umani sclerozați.

Cardiolipide. Acizii lizofosfatidici, ca atare, nu se găsesc în compoziția fosfolipidelor naturale, în schimb s-a izolat un acid polifosfatidic din țesutul cardiac, de unde denumirea de *cardiolipidă*, cu următoarea structură:



Se prezintă ca un lichid uleios, de culoare galbenă, insolubil în apă, cu un conținut ridicat în acid linoleic. Cardiolipidele au proprietăți antigenice și sînt responsabile de activitatea extractelor de inimă în reacțiile serologice de fixare a complementului, în care pot substitui antigenul specific.

1.2.4.2. SFINGOLIPIDE

La baza acestui grup stă un alcool „gras" și aminat SFINGOZINA: Δ_4-(trans)-amino-2-octadece-1,3-diol.

Substituțiile se fac la gruparea alcoolică cu acid fosforic și în continuare cu o bază azotată sau cu glucoză, galactoză, di- sau polizaharide, galactozo-6-sulfat etc.; gruparea $-NH_2$ poate fi liberă, dar de obicei este legată cu un acid gras, formînd astfel sfingofosfolipidele propriu-zise *(figura 1.30)*.

Sfingozil-fosforil-colina (din rinichi, pancreas) seamănă cu lizolecitinele și se caracterizează prin solubilitatea în apă.

Ceramidele apar ca atare (ficat, splină) sau în cursul hidrolizei sfingolipidelor.

Sfingolipidele sînt alcătuite din sfingozină, cel puțin un acid gras și fosforil-colina (sfingofosfolipide) sau oze (sfingozidolipoide). Pentru preparare, se deshidratează țesutul (creier, măduva spinării) cu acetonă rece, se elimină glicerolipidele cu eter și se extrag cu alcool la fierbere. După răcire se depune o masă de sfingolipide impure, denumite *protagen*, care mai conțin glicerofosfolipide. Purificarea în continuare se face pe baza solubilității mai mari a sfingomielinei în piridină rece față de cerebrozide; ultimele pot fi cristalizate din amestec metanol-cloroform sau acid acetic.

Sfingomielina conține ca acid gras special acidul *lignoceric*, alături de care se poate găsi acidul *nervonic* (Δ_{15}-lignoceric) și eventual stearic și palmitic. Se obține din măduva spinării de bou. Este solubilă în cloroform, cloroform-metanol, acid acetic; cu $CdCl_2$, acetat de Pb, cloroplatinat, dă săruri puțin solubile; rezistă la hidroliza alcalină la 37°, dar hidroliza alcalină mai puternică sau cu acizi în mediu alcoolic, la cald, desface colina, acidul fosforic și apoi acidul gras. Hidroliza enzimatică intervine în moduri diferite: desfacerea legăturii sfingozină-acid fosforic cu formarea lignoceril-sfingozinei prin *lecitinaza D*; desfacerea ambelor legături ale acidului fosforic de către *ceramidofosfatază* (din ficat, splină); a legăturii ami-

Scanned with OKEN Scanner

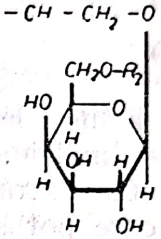
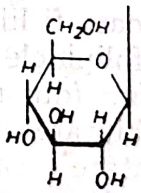
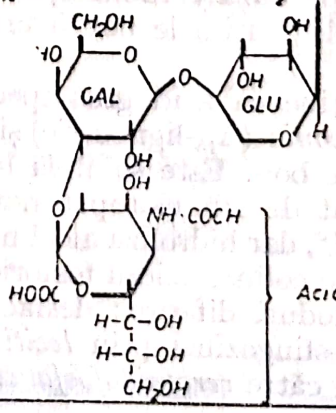
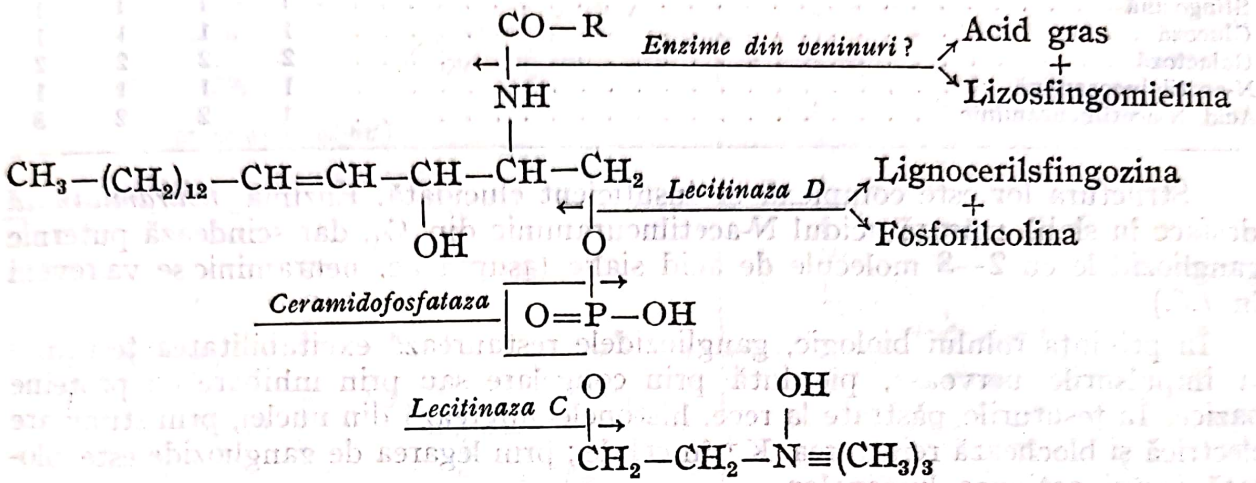
DENUMIREA	STRUCTURA
Sfingozina	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\underset{OH}{CH}-\underset{NH_2}{CH}-CH_2OH$
Ceramida	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\underset{OH}{CH}-\underset{NH-CO-R}{CH}-CH_2OH$ $-CO-R$: acid gras
Sfingofosforilcolina	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\underset{OH}{CH}-\underset{NH-R'}{CH}-CH_2-O-P-O-X$ $X = -CH_2-CH_2-\overset{OH}{N}(CH_3)_3$, $R'=H$ Sfingofosforilcolina sau Lizosfingomielina
Sfingomielina	$X = -CH_2-CH_2-\overset{OH}{N}(CH_3)_3$; R' : $-CO-R$ = acid gras: Sfingomielina
Galactozidosfingozina (Psihozina)	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\overset{OH}{CH}-\overset{NH-R_1}{CH}-CH_2-O$ $R_1=R_2=H$ psihozina  (galactoza)
Cerebrozide (Cerebrogalactozide)	$R_1=-CO-R$ (ac gras) = lignoceric cerazina $R_2=H$ = cerebronic frenozina = nervonic nervona Cerebrozide = oxinervonic oxinervona $R_1=-CO-R$ (ac gras), $R_2=-SO_3H$ } Sulfatide
Cerebrosfingozide (Glucocerebrozide)	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\overset{OH}{CH}-\overset{NH-CO-R}{CH}-CH_2-O$ $R-CO-$: ac gras  (glucoza)
Cerebropolizaharide	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\overset{OH}{CH}-\overset{NH-CO-R}{CH}-CH_2-O-X$ $R-CO-$: acid gras X : di- sau polizaharide
Ganglioziде	$CH_3-(CH_2)_{12}-CH=CH-\overset{OH}{CH}-\overset{NH-CO-R}{CH}-CH_2-O$ Sfingozina  Acid N-acetilneuraminic

Fig. 1.30. Structura şi denumirea unor sfingolipide

dice cu obţinerea lizo-sfingomielinei, cu o enzimă din veninuri (contestată de unii autori) sau a legăturii fosforilcolină, de către *lecitinaza C*, cu eliberarea colinei, după schema :

Sfingomielina :



Sfingomielina se găseşte în substanţa albă a ţesutului nervos (de exemplu în teaca de mielină), în sistemul reticulo-histiocitar ; se constată acumularea sa în boala *Niemann-Pick*.

Cerebrogalactozidele conţin, în majoritate, patru acizi graşi C_{24} : lignoceric, cerebronic, nervonic şi α-hidroxinervonic. După predominanţa acestora se cunosc ; *cerazina* (cu A.G. saturaţi), *frenozina* (cu α—OH—AG.) şi *nervona* (cu A.G. nesaturat). Sînt insolubile în alcool la rece, dar solubile la cald ; sînt solubile, la rece, în piridină, piperidină, tetralină. Purificarea se face prin cromatografie pe coloană cu alumină şi recristalizarea din metanol-cloroform. Prin hidrogenarea catalitică a dublei legături din sfingozină se obţin cerebrozide cu dihidrosfingozină, mai puţin solubile în alcool la cald.

În dozare se folosesc, în special, reacţiile de culoare caracteristice ozelor componente. Sînt răspîndite în substanţa albă şi cenuşie a creierului, unde cresc din primele luni ale vieţii ; în alte ţesuturi se găsesc în cantitate mică (inimă, corticosuprarenale, rinichi, plămîni, globule roşii). În compuşii naturali (din creier, tegumentele unor viermi paraziţi, ca de exemplu tenia) apar sub forma unor cenapse proteo-lipidice, *cerebrozido-proteine*, rezistente la enzime.

Cerebroglucozidele (cu glucoză în loc de galactoză) sînt mai rare ; în cazul dislipidozei *Gaucher* (boală metabolică) se acumulează în cantităţi anormale în splină şi sistemul reticulo-histiocitar.

Cerebrodiozide şi cerebropoliozide. Din splină s-a izolat o cerebrozidă cu glucoză şi galactoză, iar din stroma globulelor roşii, *globozidele*, cu mai multe oze. În ţesutul cerebral, se găsesc sfingolipide poliozidice, a căror cantitate creşte în boala *„gargoilism"*.

Gangliozidele conţin pe lîngă sfingozină, acid lignoceric şi oze, *acidul neuraminic* (derivatul N-acetilat al acestuia este acidul sialic, din mucinele salivare). Se recunosc prin reacţiile pe care le dă acidul neuraminic : culoare roşie-violacee prin încălzire cu reactivul *Bial* (orcină : HCl : $FeCl_3$) ; culoare roşie prin încălzire cu reactivul *Ehrlich* (p-dimetilbenzaldehidă) ; reacţia cu ninhidrina etc.

Scanned with OKEN Scanner

După izolarea de fosfolipidele care le contaminează s-au obținut patru gangliozide cristalizate *(Kuhn, Wiegandt)* și anume:

Componenți: / *Gangliozide:*	G_1	G_2	G_3	G_4
Acizi grași	1	1	1	1
Sfingozină	1	1	1	1
Glucoză	1	1	1	1
Galactoză	2	2	2	2
N-acetilglucozamină	1	1	1	1
Acid N-acetilneuraminic	1	2	2	3

Structura lor este complexă și insuficient elucidată. Enzima *neuramidinază* desface în slabă măsură acidul N-acetilneuraminic din G_1, dar scindează puternic gangliozidele cu 2—3 molecule de acid sialic (asupra ac. neuraminic se va reveni în *1.3.*)

În privința rolului biologic, gangliozidele restaurează excitabilitatea țesutului la impulsurile nervoase, pierdută prin congelare sau prin inhibare cu proteine bazice. În țesuturile păstrate la rece, histonele migrează din nuclei, prin stimulare electrică și blochează reintrarea K^+ în celule; prin legarea de gangliozide este blocată însăși acțiunea histonelor.

Tot din această grupă face parte și *strandina*, izolată din substanța cenușie a creierului *(Folk, 1951)*, caracterizată prin solubilitate sa în apă și cloroform, prin gr. mol. mare (peste 250.000) și prin produșii hidrolizei: sfingozină (sau alte amine „grase" analoage), acizi grași, oze aminate și o substanță cromogenă, care devine brună prin încălzire cu HCl 6 N la 100°/15 min (asemănător cu ac. sialic).

Cerebrosulfatidele se obțin din extractele fosfolipidice impure și se recunosc prin prezența radicalului sulfat, legat de obicei la C_6 al galactozei.

1.2.4.3. INOZITOLFOSFATIDE

Inozitolfosfatidele conțin, pe lîngă A.G., glicerină, acid fosforic, *inozitolul*, un alcool ciclic (ciclohexanhexaol). După raportul molecular: P/inozitol, se cunosc: *monofosfatinozitide*, cu raportul de 1 (izolate din germenii de grîu, inima de bou) și *difosfoinozitide* cu raportul de 2 (din creier, boabele de soia etc.); s-au obținut și difosfoinozitide cu un singur acid gras, în care se produce o ciclizare prin intermediul celor două molecule de acid fosforic, denumite *lizodifosfoinozitide ciclice* (soia, arachide), precum și produși mai complicați care conțin și oze, *inozitolfosfatozide (figura 1.31)*.

Lipozitolul, izolat din soia *(Wooley, 1943)* reprezintă un complex alcătuit din fosfoinozitide, galactoză, arabinoză (probabil și alte oze fixate de inozitol) și uneori cu colamină și ac. tartric.

Din bacterii s-au obținut produși lipsiți de glicerină, în care acizii grași esterifică direct inozitolul sau o oză.

Izomerul *mezo* al inozitolului este o vitamină (*2.1.13*) cu acțiune lipotropă; esterificat cu 6 mol. acid fosforic constituie *inozithexafosfatul* (acidul fitinic), care apare sub formă de săruri de Ca și Mg (fitinați).

Scanned with OKEN Scanner

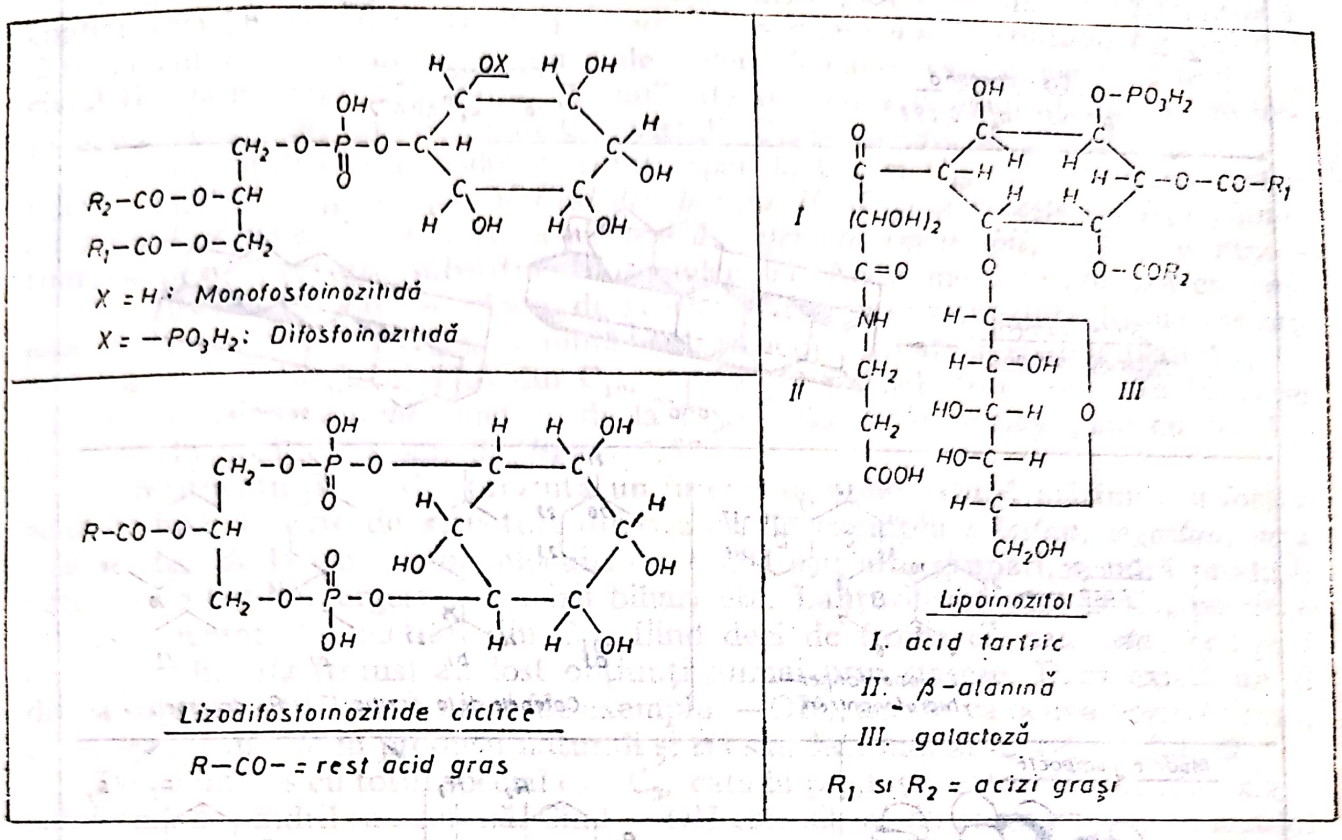


Fig. 1.31. Structura și denumirea unor inozitolfosfatide

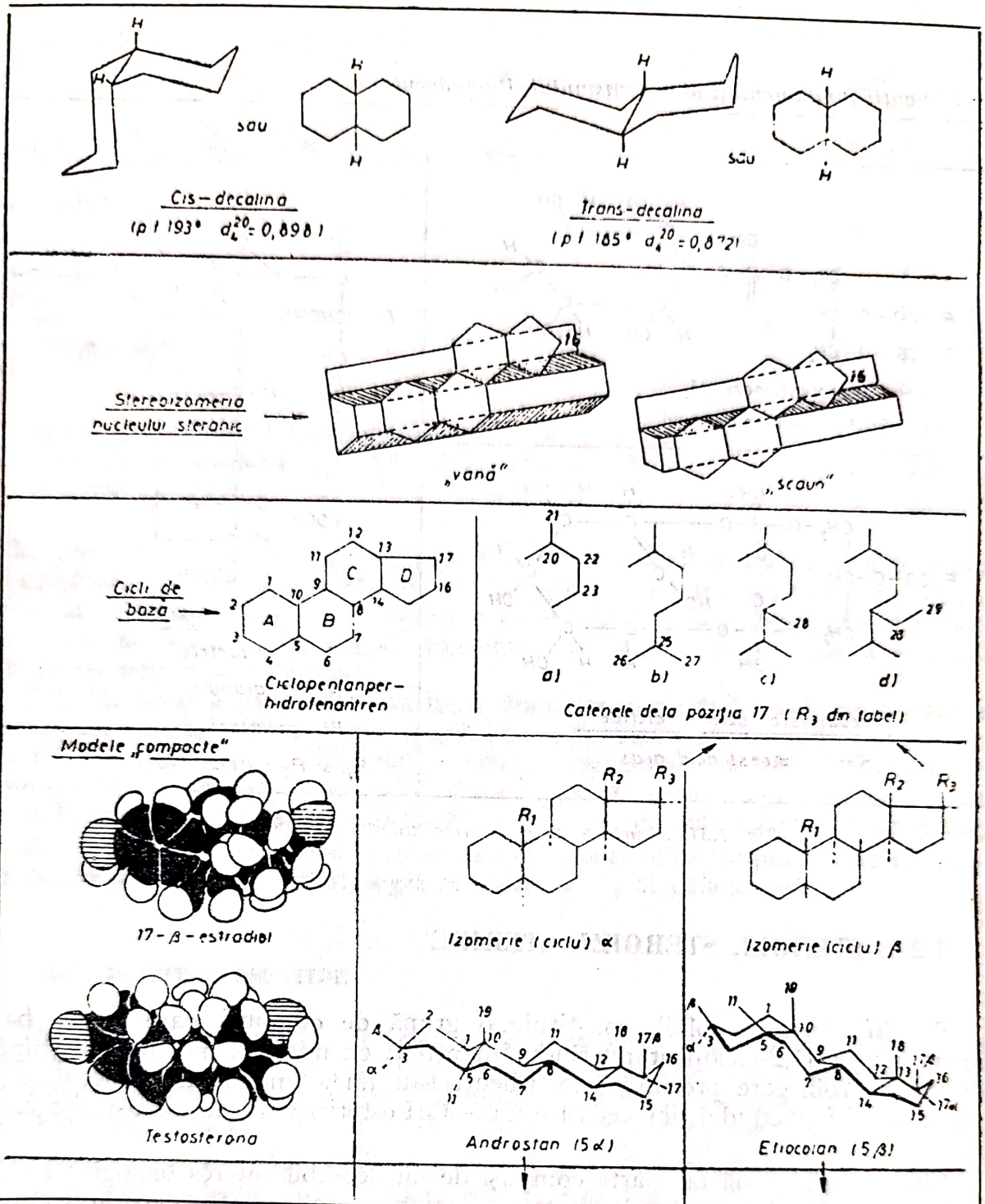
1.2.5. STEROLI. STEROIZI. STERIDE

Sterolii (*stereos* = solid) constituie o grupă de compuși care au la bază nucleul *steran* (1,2-ciclopentanperhidrofenantren) cu una sau mai multe grupări hidroxil; sterolii care prezintă substituenți sau unele modificări moleculare se numesc *steroizi* (steroide), iar cei care au —OH esterificat cu acizi grași reprezintă *steridele*.

Din această grupă fac parte compuși de un deosebit interes biologic: *sterolii ca atare* (colesterol, ergosterol, sitosterol., stigmasteroli) dintre care unii cu rol de provitamine D *(2.1.3.1)*; alții cu rol de *hormoni:* hormonii steroizi sexuali, corticosuprarenali; acizii biliari; steroizii cardiotonici; steridele etc.

Structura și stereochimia sterolilor

Considerînd hidrocarbura de bază ipotetică *ciclopentanperhidrofenantrenul* sau *steranul* apar 6 C asimetrici situați la locul de întîlnire a celor patru cicli (în 5, 8, 9, 10, 13 și 14) care dau teoretic posibilitatea formării a 2^6 sterani stereoizomeri, grupați în două serii. În plus, situarea în spațiu în formă de „vană" sau „scaun" mărește posibilitățile de stereoizomerie. În realitate însă numărul conformațiilor întîlnite în natură este mult mai mic decît cel prevăzut teoretic. Se cunosc astfel, cu privire la ciclurile A și B, formele *cis* și *trans* (similar cu decalina); considerînd ca criteriu de referință poziția H din 5 și 10 apar două serii de izomerie: seria *cis* sau *normală, steran* sau β și seria *trans, allosteran* sau α *(fig. 1.32)*



Nr. at. C	R_1 (10)	... (13)	$R_{..}$ (17)	Seria α (trans)	Seria β (cis)
17	H	H	H	5-α-GONAN (= STERAN)	5-β-GONAN
18	H	CH_3	H	5-α-ESTRAN	5-β-ESTRAN
19	CH_3	CH_3	H	5-α-ANDROSTAN (= TESTAN)	5-β-ANDROSTAN (= ETIOCOLAN)
21	CH_3	CH_3	C_2H_5	5-α-PREGNAN (= ALLOPREGNAN)	5-β-PREGNAN
24	CH_3	CH_3	a) $=C_5H_{11}$	5-α-CHOLAN (ALLOCOLAN)	5-β-CHOLAN
27	CH_3	CH_3	b) $=C_8H_{17}$	5-α-CHOLESTAN	5-β-CHOLESTAN (= COPROSTAN)
28	CH_3	CH_3	c) $=C_9H_{19}$	5-α-ERGOSTAN	5-β-ERGOSTAN
29	CH_3	CH_3	d) $=C_{10}H_{21}$	5-α-STIGMASTAN	5-β-STIGMASTAN

Fig. 1.32. Structura și izomeria decalinei. Modele „compacte" pentru 17 β-estradiol și testosteronă. Structura, izomeria și denumirea ciclilor de bază (a—d) din care derivă diferiții steroizi din seria α (trans) și seria β (cis), conform tabelului cu substituiri de mai sus.

Scanned with OKEN Scanner

Studiile fizico-chimice arată că pentru ciclurile A şi B în *cis* este compatibilă configuraţia *„vană"* şi pentru A/B *trans*, accea de *„scaun"*; configuraţia ciclului C nu prezintă interes din acest punct de vedere deoarece este în legătură *trans* cu ciclul B şi ia numai configuraţia *„scaun"*; de asemenea şi ciclul D, căruia i se impune o poziţie *trans* faţă de ciclul C; „vîrful" C_{16} se găseşte în planul C.

În majoritatea compuşilor naturali apar la C_{10} şi C_{13} substituiri cu metili (metili angulari: C_{18} şi C_{19}). *Metilul din poziţia 10* (C_{18}) *se găseşte în faţa planului general al moleculei şi se ia ca element de referinţă invariabil*, faţă de el raportîndu-se poziţia tuturor substituenţilor moleculei. Acest metil se notează cu *linie plină*; substituenţii care se găsesc de aceeaşi parte cu el reprezintă forma *cis* sau *beta* (β) şi se notează tot cu linie plină; substituenţii situaţi în spatele planului, de cealaltă parte faţă de metilul din C_{10}, reprezintă formele *trans* sau *alfa* (α) şi se notează cu *linie punctată*; metilul de la C_{13} se găseşte în acelaşi plan cu cel din C_{10}, deci în poziţie *cis* sau β *(figura 1.32)*.

Substituenţii de la C_{17} prezintă un interes deosebit. După mărimea şi forma acestora apar o serie de structuri diferite ca de exemplu *colestan, ergostan, acid colanic* etc., de la care, prin înlocuiri cu —OH sau alte grupări, rezultă produşii naturali: colesterol, ergosterol, acizii biliari etc. Lanţurile ataşate la C_{17} prezintă aceeaşi orientare cu metilul din C_{10}, fiind deci de froma *cis* sau *beta*; compuşi cu lanţuri în *alfa* (trans) au fost obţinuţi numai prin sinteze. Dacă există un al doilea substituent la acest nivel (de exemplu —OH), acesta va ocupa poziţia liberă, adică *trans* sau *alfa* în produşii naturali şi *cis* sau *beta* numai în cei de sinteză.

De un interes cu totul special este C_3, care în produşii naturali prezintă oxigen sub formă de oxidril sau cetonă. Cînd —OH este situat de aceeaşi parte cu metilul din C_{10} reprezintă seria β (linie plină), iar cînd este de partea opusă, seria α (linie punctată). În colesterol şi acidul litocolic, oxidrilul este în β, dar se cunosc şi forme α (de exemplu, în alţi acizi biliari). Prin intermediul cetonei se poate trece de la o serie de izomerie la alta *(figura 1.33)*.

În afară de aspectele menţionate pot apare şi alte tipuri de izomerie şi o serie de compuşi care prezintă duble legături şi care vor fi semnalaţi în cazurile respective. De asemenea, se utilizează o serie de reguli, denumiri şi simboluri, care ajută definirea şi caracterizarea compuşilor din această clasă, astfel; de exemplu:

— În denumirea chimică a produşilor sterolici trebuie să se precizeze tipul de izomerie la care aparţine compusul respectiv. În cazul în care configuraţia unuia sau mai multor atomi de C nu se cunoaşte, acest fapt se indică prin litera ξ (csi), specificînd şi numărul atomului de C;

— Hidrocarbura fără metili în C_{10} şi C_{13} se denumeşte *gonan* iar cea cu un singur metil în C_{13}, *estran*;

— Cu prefixul *nor-* se notează un omolog inferior şi cu *homo-*, unul superior, indicîndu-se C la care are loc modificarea; în cazul că această precizare lipseşte se consideră că amputarea sau adăugarea s-a făcut la atomul de C cu cel mai mare indice numeric, de exemplu, *nor*colanul reprezintă colanul fără C_{24}, iar *nor*colestanul indică scheletul colestanului fără C_{27}; amputarea a 2 sau 3 atomi de C se notează prin *bis-nor-*, respectiv *tri-nor-*. Aceleaşi prefixe se utilizează şi pentru „contracţia" *(nor)* sau „mărirea" (homo) ciclilor, indicînd cu literă mare ciclul în cauză, de exemplu, A-nor-5α-androstan;

— Prefixul *etio-* arată că lanţul lateral a fost înlocuit cu o grupare funcţională, de exemplu, etiocolanona, care are o cetonă în C_{17};

— Prefixul *epi-* se utilizează pentru alcoolii stereoizomeri ai unui compus care beneficiază de o denumire uzuală, de exemplu, epiandrosterona;

— Prefixul *izo-* indică inversarea sterică la nivelul unei legături C—C sau C—H;

— Prefixul *dehidro-* arată eliminarea a 2 atomi de H cu formarea unei duble legături (de exemplu, 7-dehidrocolesterolul) sau, de la gruparea alcool, formarea unei cetone (de exemplu, acidul dehidrocolic); dacă dehidrogenarea este dublă se va nota cu *bis-dehidro-*;

— Pentru sterolii parţial nesaturaţi sau aromatici se utilizează şi denumirea de bază cu sufixul *-enă*, de exemplu, estra-1,3,5(10)-triena;

Scanned with OKEN Scanner

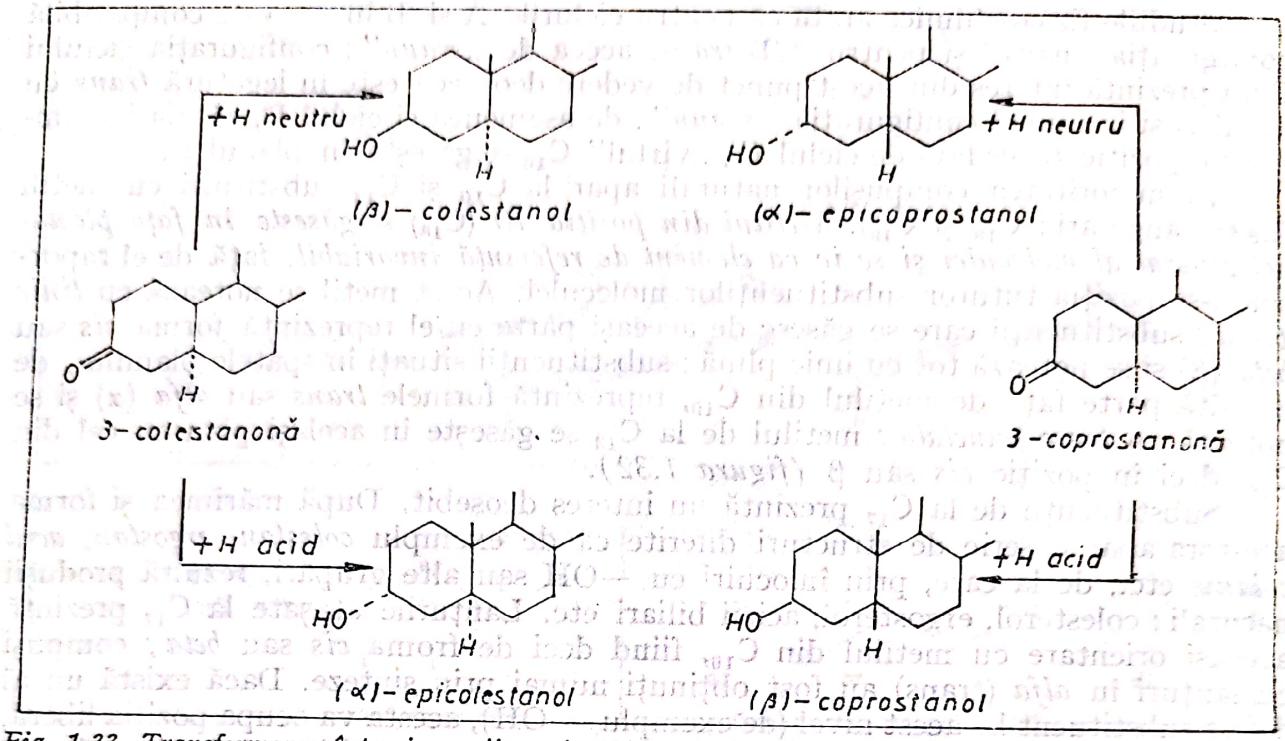


Fig. 1.33. Transformarea între izomerii α și β-hidroxilați, prin intermediul 3-cetonei în seria colestan și coprostan

— Prefixul *desoxi-* arată pierderea unui OH alcoolic (de exemplu, acidul desoxicolic), iar prefixul *desoxo-* a unui O carbonilic;

— Prefixul *dihidro-* sau *reducto-* indică fixarea a doi atomi de H, fie la o dublă legătură (de exemplu, dihidrocolesterol), fie reducerea unei grupări cetonă la alcool;

— Prefixul *seco-* denotă ruperea unui ciclu, indicînd denumirea substanței de bază și ciclul la care are loc ruperea (de exemplu, vitaminele D sînt derivați seco-B-; *a se vedea 2.1.3.*);

— Pentru compușii care au un al *cincilea ciclu*, frecvent întîlniți în substanțe naturale active farmacodinamic, se utilizează *denumiri de bază*, ca de exemplu, cardolonidă, bufanolidă, spirostan, furostan.

— Prezența unor heteroatomi în ciclu se notează ca și în chimia organică, de exemplu, pentru oxigen cu *-oxa-* *(figura 1.34)*.

Clasificarea sterolilor se poate face, simplu, după originea lor, de exemplu, *zoosteroli* (colesterol), *fitosteroli* (stigmasterol, sitosterol), *micosteroli* (de exemplu, ergosterolul din ciuperci).

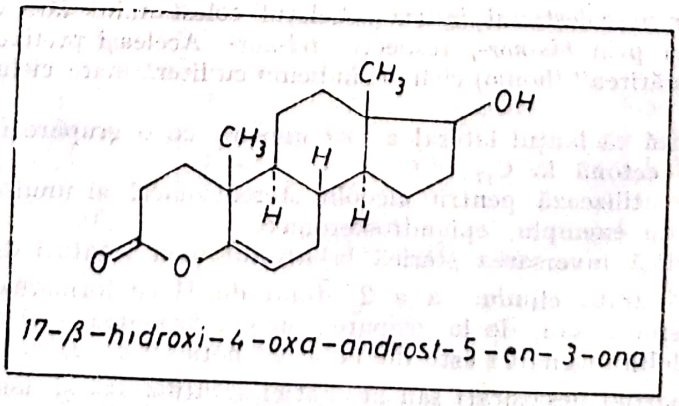


Fig. 1.34. Model de nomenclatură.

1.2.5.1. DESCRIEREA UNOR GRUPE DE STEROLI ȘI DERIVAȚI

1.2.5.1.1. *COLESTEROLUL*

Colesterolul se găsește în stare liberă și sub formă de esteri cu acizii grași, *steride*. Inițial s-a obținut din calculii biliari (care pot conține pînă la 98% colesterol) apoi din țesutul nervos (creier, măduva spinării), cu un randament de 10% din materia uscată, din gălbenușul de ou (randament 2%), lanolină etc. În principiu, se efectuează o extracție cu alcool fierbinte în mediu cu puțin KOH și se purifică parțial din alcool/eter; pentru o purificare mai avansată se recurge la derivatul dibromurat (cristalizat).

F.R.IX prevede *Cholesterolum, colesterol*, pulbere cristalină albă sau slab gălbuie, sau foi cristaline sidefii, fără gust și aproape fără miros; la lumină și căldură se colorează în galben. Este ușor solubil în eter, solubil în benzen, cloroform, dioxan, hexan, eter de petrol, uleiuri și grăsimi, puțin solubil în alcool, practic insolubil în apă. Are p.t. 147—150° și $(\alpha)_D^{20} = -34°$ pînă la $-38°$ (c = 2 în dioxan).

Prin reducere se saturează dubla legătură din 5—6, obținîndu-se alcoolul saturat, *colestanolul;* bacteriile intestinale îl reduc la izomerul său, *coprostanolul (figura 1.35)*.

Colesterolul are un caracter de lipidă neutră care intră, alături de fosfolipide (caracter acid), în structura membranelor celulare animale, în timp ce ergosterolul intră în cele vegetale și în levuri, iar membranele bacteriene sînt aproape lipsite de steroli. Colesterolul are de asemenea un rol antihemolitic deoarece forma sa liberă se combină cu saponozidele, hemolizinele paraziților și lizocitinele (Minovici),

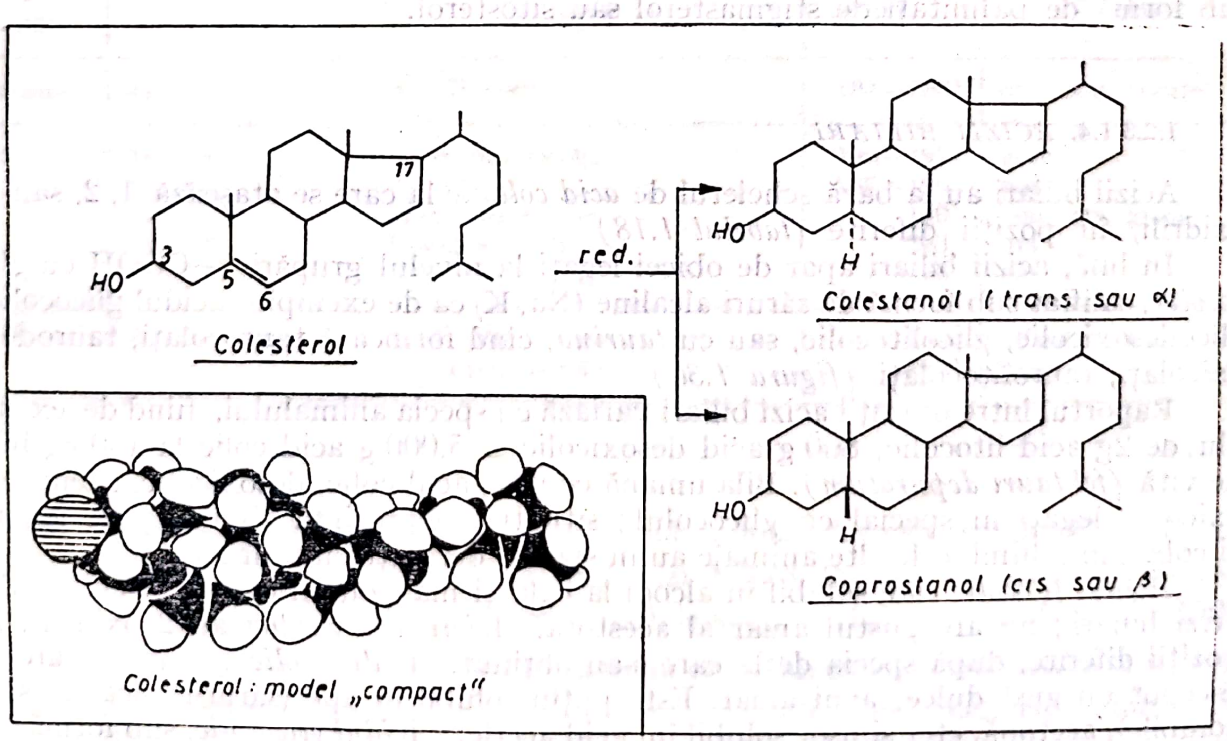


Fig. 1.35. Reducerea colesterolului și ilustrarea modelului „compact"

precum şi un rol antitoxic; de asemenea ia parte în emulsionarea grăsimilor efectuată de acizii biliari la nivelul intestinului.

Alături de colesterol, în organismele animale, se găseşte şi *7-dehidrocolesterolul* (provitamină D), iar în insaponificabilul lanolinei se găseşte 25% colesterol şi 20% *„izosteroli"*, un amestec de lanosterol şi agnosterol, precursori în biosinteza colesterolului.

1.2.5.1.2. *STEROLII VEGETALI*

Ergosterolul a fost descoperit de *Tanret* în secara cornută (ergot de seigle, sclerotul ciupercii *Claviceps purpurea* care se dezvoltă în ovarul secarei); ulterior s-a găsit şi în alte vegetale, drojdia-de-bere, alge, bacterii şi chiar în piele (4% din totalul sterinelor). *Stigmasterolii* şi *sitosterolii* se găsesc în plante şi sub formă dehidrogenată în poziţia 7—8 şi servesc, ca şi 7-dehidrocolesterolul şi egosterolul ca provitamine D *(2.1.3)*, de asemenea şi ca materie primă pentru sinteze, de exemplu, hormoni.

1.2.5.1.3. *STERIDELE*

Steridele sînt lipide (esteri ai sterolilor cu acizii graşi) prezente în plasma sanguină, ţesuturi, grăsimile epidermice etc. Sinteza lor se poate realiza prin reacţia dintre steroli şi acizii graşi la temperaturi ridicate, sau, mai bine, prin acţiunea clorurii sau anhidridei acidului gras asupra sterolilor. Steridele naturale conţin în special acid linoleic şi palmitic esterificaţi la OH/3 al colesterolului; sînt hidrolizate chimic sau enzimatic, prin *colesterolesteraze*. În regnul vegetal apar în special sub formă de palmitaţi de stigmasterol sau sitosterol.

1.2.5.1.4. *ACIZII BILIARI*

Acizii biliari au la bază scheletul de *acid colanic* la care se ataşează 1, 2, sau 3 oxidrili, în poziţii diferite *(tabelul 1.18)*

În bilă, acizii biliari apar de obicei legaţi la nivelul grupării —COOH cu *glicocolul*, salifiat sub formă de săruri alcaline (Na, K) ca de exemplu, acidul glicocolic, glicodesoxicolic, glicolitocolic, sau cu *taurina*, cînd formează taurocolaţi, taurodesoxicolaţi, taurolitocolaţi *(figura 1.36)*

Raportul între diferiţii acizi biliari variază cu specia animalului, fiind de exemplu, de 2g acid litocolic, 800 g acid desoxicolic şi 5.000 g acid colic la 100 kg bilă de vită *(fel tauri depuratum)*. Bila umană conţine acid colic, desoxicolic, chenodesoxicolic, legaţi în special cu glicocolul; situaţia se prezintă similar şi la iepure şi cobai, în schimb celelalte animale au în special derivaţi cu taurina.

Acidul litocolic este solubil în alcool la cald şi mai solubil în eter decît ceilalţi acizi biliari; nu are gustul amar al acestora. *Acizii desoxicolici* au 2 oxidrili, în poziţii diferite, după specia de la care s-au obţinut. *Acidul colic* sau *colalic* are la început un gust dulce, apoi amar. Este puţin solubil în apă (sărurile alcaline sînt solubile), acetonă, eter şi uşor solubil în acid acetic. *Acidul glicocolic*, sub formă de săruri de Na, K, se găseşte în bila umană şi a ierbivorelor şi lipseşte de la carnivore.

Scanned with OKEN Scanner

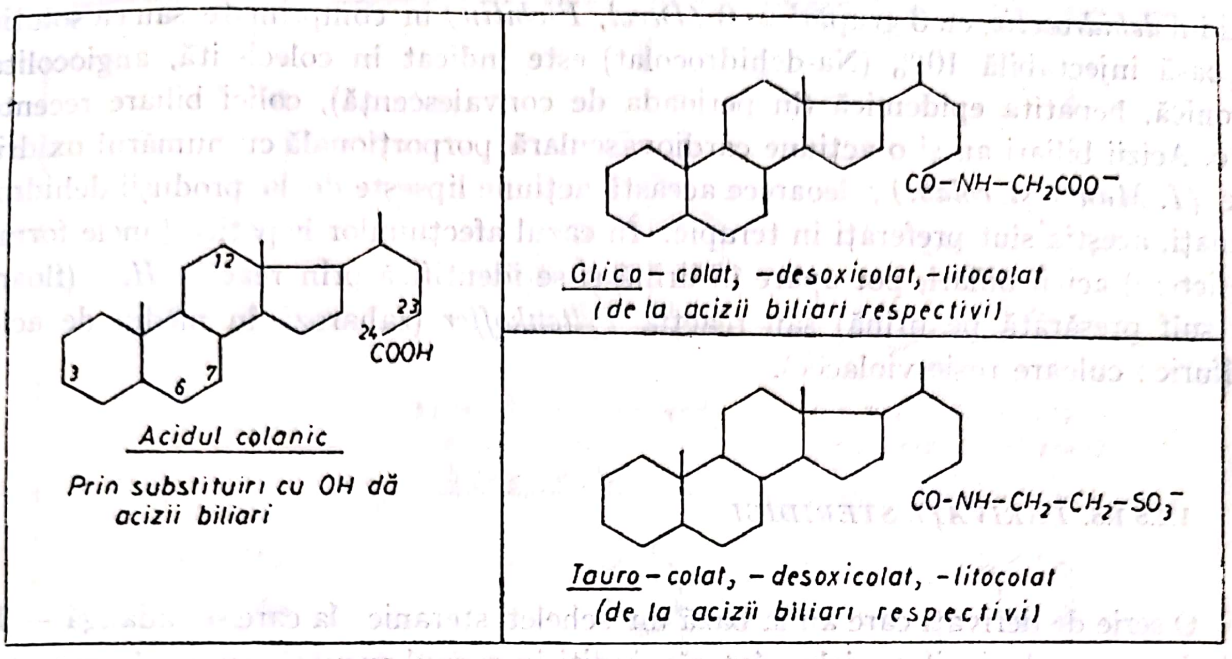


Fig. 1.36. Formula de bază (acid colanic) de la care prin substituiri cu oxidrili în diferite poziții se obțin acizii biliari, conform Tabelului nr. 1.18

TABELUL 1.18

Acizii biliari mai importanți
(după M. Javillier și colab., 1959)

Nr. oxidrili	Poziția OH	Denumire	p.t.	Origine
mono-	3α	Ac. litocolic	184—186°	om, bou, iepure
di-	3α; 6α	— hiodesoxicolic	196—197°	porc
	3β; 6α	— ,,	189—190°	porc
	3α; 7α	Chenodesoxicolic	140°	bou, urs, gîscă
	3α; 7β	Ursodesoxicolic	203°	urs
	3α; 12α	Desoxicolic	176°	om, bou
tri-	3α; 7α; 12α	Acid colic	196—198°	diferite anim.
	3?; 7?; 23?	Ac. α-phocaecolic	222—223°	focă

Acidul taurocolic apare în cantități mici în bilă umană, dar este singurul acid biliar din bila cîinelui; spre deosebire de ceilalți acizi biliari, la care numai sărurile alcaline sînt solubile, acesta prezintă săruri solubile și cu metalele grele (Ag, Cu, Pb).

Rolul biologic al acizilor biliari se bazează pe acțiunea lor tensioactivă prin care produc emulsionarea grăsimilor prin formarea complecșilor coleinici, combinații „acizi biliari-acizi grași", solubile în apă. Au acțiune coleretică și colagogă, mai accentuată la produșii care au grupări cetonice în loc de cele hidroxilice. Astfel,

Scanned with OKEN Scanner

acidul *dehidrocolic*, cu 3 grupări = O *(Decol, Fiobilin)* în comprimate sau ca soluție apoasă injectabilă 10% (Na-dehidrocolat) este indicat în colecistită, angiocolita cronică, hepatita epidemică (în perioada de convalescență), colici biliare recente etc. Acizii biliari au și o acțiune cardiovasculară, porporțională cu numărul oxidrilor *(I. Manta și colab.)*; deoarece această acțiune lipsește de la produșii dehidrogenați, aceștia sînt preferați în terapie. În cazul afecțiunilor hepatice (unele forme de ictere) acizii biliari, pot apare în urină și se identifică prin reacția *Hay* (floare de sulf presărată pe urină) sau reacția *Pettenkoffer* (zaharoză în mediu de acid sulfuric: culoare roșie-violacee).

1.2.5.1.5. *DERIVAȚI STERIDICI*

O serie de derivați care au la bază un schelet steranic, la care se adaugă — de obicei — un al cincilea ciclu, sînt răspîndiți în regnul vegetal (cu unele excepții, și la animale, de exemplu, la broască) și se utilizează în terapie (în special cardiotonice). Structura și denumirea unor asemenea derivați este prezentată în *figura 1.37*

Heterozidele cardiotonice, cu efecte asupra mușchiului cardiac, se găsesc în special în apocinee, liliacee, ranunculacee, scrofulariacee. Prin hidroliză dau o parte glucidică și una agluconică, denumită *genină* (mai corect ar fi genol). Principalii agliconi digitalici sînt prezentați în *figura 1.38.*

Agliconii tipici (cu excepția scilaridinei A) au formula generală: $C_{23}H_{34}O_n$ (n = 4—8). Din bulbul de *Scilla maritima* s-au obținut glicozizi cu efecte farmacodinamic similare, ca de exemplu *scilarenul A* (din bulbii albi) și *scilirozidul* (din bulbii roșii) *(figura 1.39)*.

Bufotoxine („venin de broaște"). Glandele pielii unor broaște secretă o serie de substanțe, de exemplu, bufotoxina *(Wieland, 1926)* izolată de la *Bufo vulgaris* care are o acțiune asupra inimii similară cu a digitalicelor. Este un ester al suberilargininei cu o genină, *bufotalina.*

Sapogeninele. Saponozidele (saponine) sînt răspîndite în frunzele, rădăcinile și semințele diferitelor plante. Au proprietatea de a produce spumă prin agitare cu apa și au efecte hemolizante. Prin hidroliză dau o parte sterolică (unele dau compuși triterpenoizi) și o parte glucidică. După natura lanțului lateral, saponinele se clasifică în trei tipuri: spiranice, furanice și cu lanț lateral similar colesterolului. Cea mai importantă sapogenină este *diosgenina*, care se găsește în proporție de 1—5% în rădăcinile unor specii de liliacee și dioscoridacee și servește pentru obținerea, prin semisinteză, a hormonilor steroizi, *(figura 1.40)*

Alcaloizi de natură sterolică. O serie de alcaloizi și glucoalcaloizi au fost izolați din solanacee, de exemplu *solanina* (din *Solanum tuberisicum*, cartof, sau din *Lico-*

Scanned with OKEN Scanner

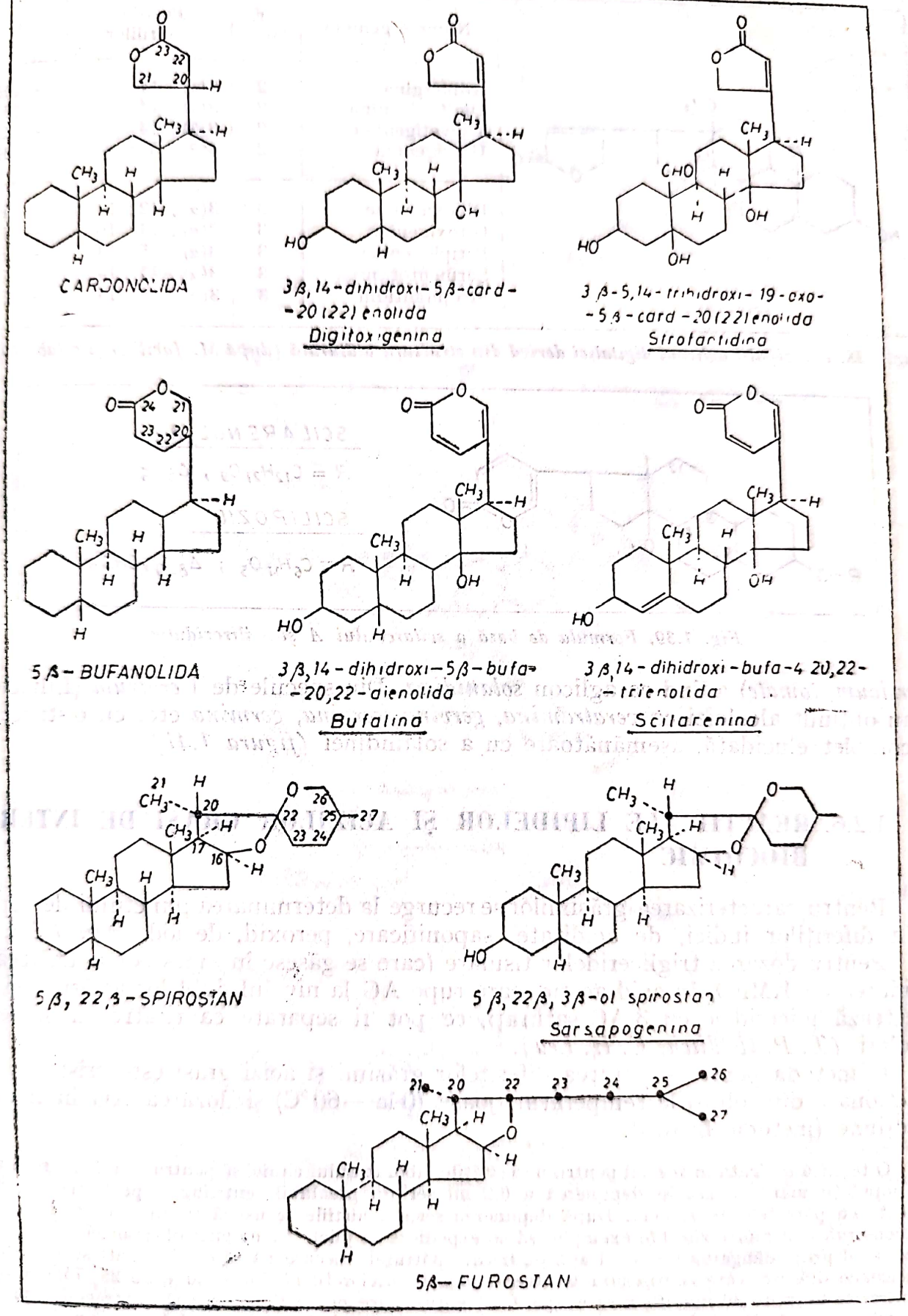
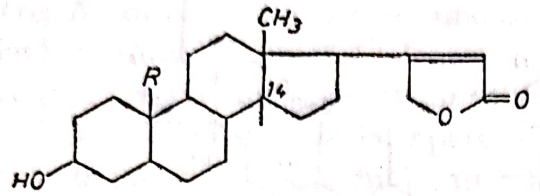


Fig. 1.37. Structura și denumirea unor derivați steridici. (după Comisia internațională a Uniunii pentru chimie pură și aplicată pentru Nomenclatura de chimie biologică, *J. Am. Chem. Soc., 82,* 5575, 1960).

Scanned with OKEN Scanner



Numele geninei	Nr. OH	Poziția oxidrililor	R
Adinergina	2	3(α); 14	$-CH_3$
Digitoxigenina	2	3(α); 14	$-CH_3$
Thevetigenina	2	3(β); 14	$-CH_3$
Uzarigenina	2	3(β); 5(?)	$-CH_3$
Digoxigenina	3	3(α); 12; 14	$-CH_3$
Gitoxigenina	3	3(α); 14; 16	$-CH_3$
Periplogenina	3	3(α); 5; 14	$-CH_3$
Sarmentogenina	3	3(α); 11; 14	$-CH_3$
Strophantidina	3	3(α); 5; 14	$-CHO$

Fig. 1.38. Principalii agliconi digitalici derivă din structura alăturată (după M. Javillier și colab., 1959)

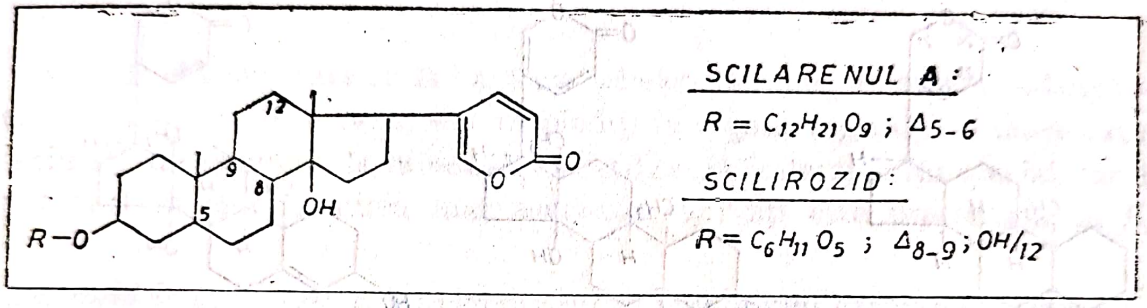


Fig. 1.39. Formula de bază a scilarenului A și scilirozidului

persicum, tomate) avînd ca aglicon *solanidina*. Din speciile de *Veratrum* (Liliaceea) s-au obținut alcaloizi ca *veratramina, gervina, cervina, germina* etc. cu o structură incomplet elucidată, asemănătoare cu a solanidinei *(figura 1.41)*

1.2.6. REACȚII ALE LIPIDELOR ȘI ACIZILOR GRAȘI DE INTERES BIOCHIMIC

Pentru caracterizarea grăsimilor se recurge la determinarea punctului de topire și a diferiților indici, de aciditate, saponificare, peroxid, de iod *(vezi 1.2.3.1)*.

Pentru dozarea trigliceridelor tisulare (care se găsesc în amestec) se utilizează oxidarea cu $KMnO_4$ în acid acetic, care rupe AG la nivelul dublelor legături și nu afectează gliceridele cu 3 AG saturați, ce pot fi separate cantitativ cu solvenți apolari *(T. P. Hilditch, C. H. Lea)*.

O metodă pentru separarea diferitelor grăsimi și acizi grași este cristalizarea fracționată din soluții la temperaturi joase (0 la —60 °C) și dozarea AG în fiecare fracțiune (metoda Brown).

O tehnică indicată în special pentru necesitățile laboratorului clinic și pentru studii „screening" (pe populații mari) constă în depunerea a 0,2 ml ser (în prealabil centrifugat) pe hîrtie de filtru marcată cu pătrățele de 1/1 cm. După depunerea serului hîrtiile se usucă și sub această formă se pot conserva mai multe zile (de exemplu, să se expedieze în plic). În momentul analizei se rehidratează serul prin adăugarea a 0,4 ml apă pe fiecare pătrățel; fiecare pătrățel (decupat) se introduce în flacoane diferite, care conțin 50 ml solvent (alcool: tricloretilenă, în volume de 25 : 75), se lasă la extracție timp de 30 minute și se evaporă solventul (care poate fi recuperat). Extractele lipidice (uscate) se solvă în 20 ml cloroform, se pun în contact cu zeolit (imbibat în prealabil cu ser fiziologic) și se iau patru părți alicuote (fiecare corespunzînd la 0,02 ml ser inițial) în patru eprubete, dintre

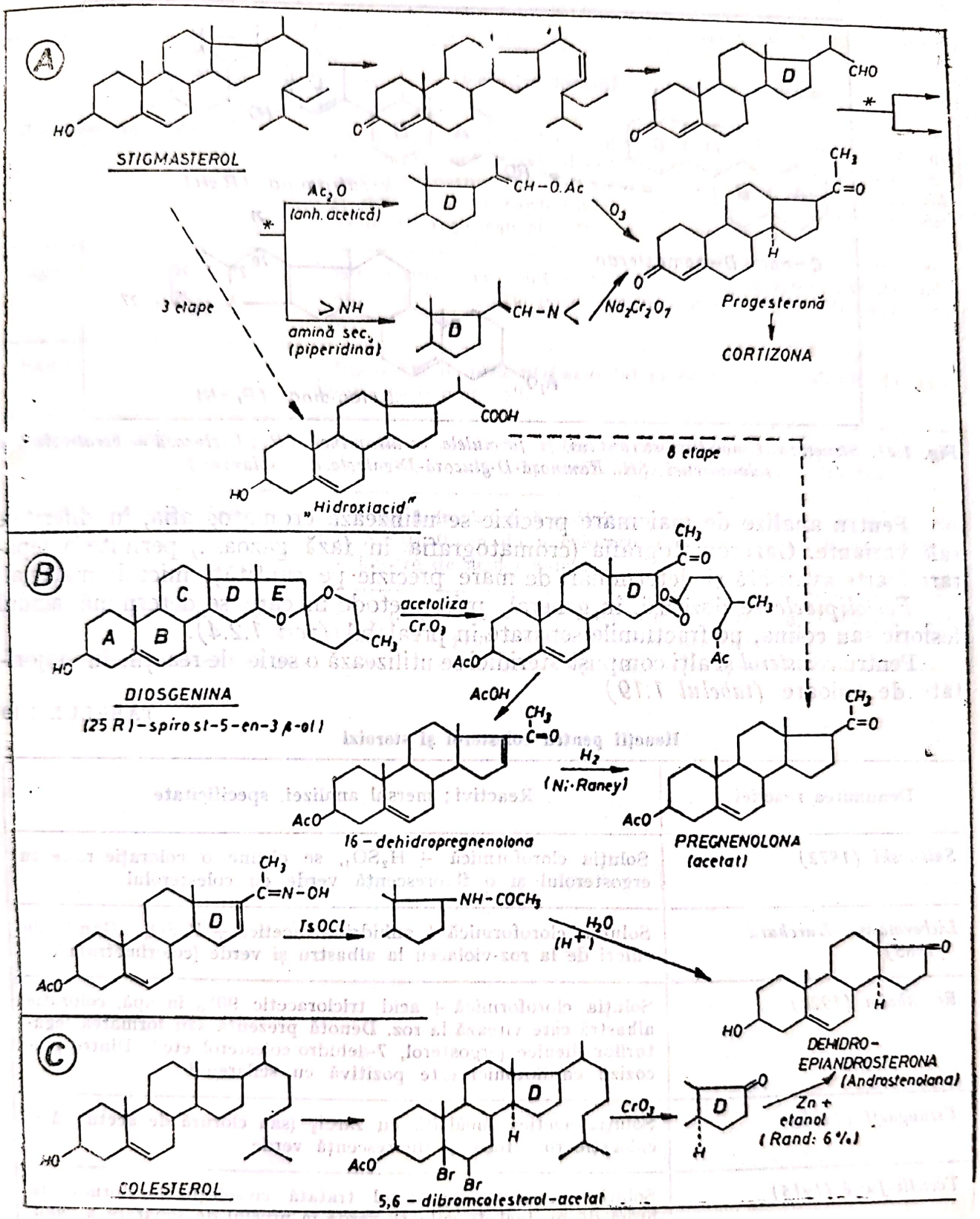


Fig. 1.40. Obţinerea prin semisinteză a unor hormoni steroizi, din stigmasterol (A), diosgenină (B şi colesterol (C)

care două se supun saponificării şi două nu. Final se aplică reacţii de dozare corespunzătoare (colorimetrice, spectrofotometrice etc.). Această tehnică permite extragerea, atît a lipidelor neutre cît şi a colesterolului şi fosfolipidelor şi prezintă astfel avantajul de a permite determinarea simplă şi comodă, a tuturor fracţiunilor lipidice importante din ser *(J. Etienne, A. Alvarez, J. Cottet, 1969)*.

Scanned with OKEN Scanner

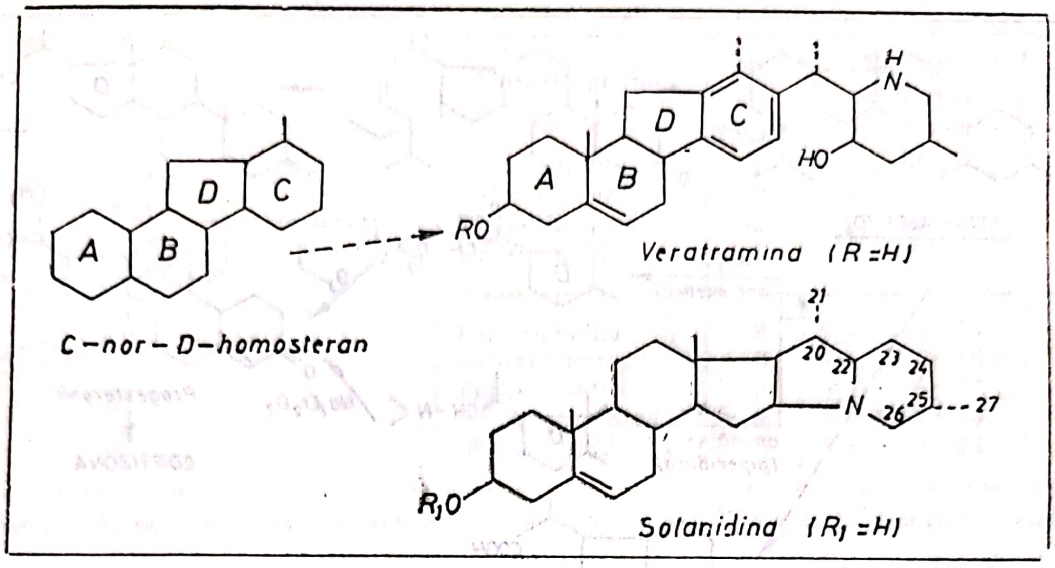


Fig. 1.41. Structura C-nor-homosteranului și formulele veratraminei (R_1: D-glucoză = veratrozin) și solanidienei (R: Ramnoză-D-glucoză-D-galactoză = solanina)

Pentru analize de mai mare precizie se utilizează cromatografia, în diferitele sale variante. Gazcromatografia (cromatografia în fază gazoasă) permite o separare foarte avansată și determinări de mare precizie pe cantități mici de material.

Fosfolipidele se dozează, în general, prin metode în care se determină acidul fosforic sau colina, pe fracțiunile separate în prealabil *(vezi 1.2.4)*.

Pentru *colesterol* și alți compuși steridici se utilizează o serie de reacții, în majoritate de culoare *(tabelul 1.19)*

TABELUL 1.19

Reacții pentru colesterol și steroizi

Denumirea reacției	Reactivi; mersul analizei, specificitate
Salkovski (1872)	Soluția cloroformică + H_2SO_4, se obține o colorație roșie cu ergosterolul și o fluorescență verde cu colesterolul
Liebermann—Burchard (1885)	Soluția cloroformică + anhidridă acetică + H_2SO_4. Gamă de culori de la roz-violaceu la albastru și verde (colorimetrabilă)
Rosenheim (1929)	Soluția cloroformică + acid tricloracetic 90% în apă, colorație albastră care virează la roz. Denotă prezența sau formarea legăturilor dienice (ergosterol, 7-dehidro-colesterol etc.). Dintre glucozizii cardiotonici este pozitivă cu scilarenul
Tschugaeff (1900)	Soluția acetică încălzită cu $ZnCl_2$ (sau clorură de acetil) dă o colorație roz—roșie și fluorescență verde
Tortelli-Jaffé (1915)	Soluția acetică de ergosterol tratată cu soluție cloroformică de brom dă un inel de culoare verde la nivelul de separare a celor două lichide
Lifschütz (1908)	Soluția acetică de colesterol se tratează cu peroxid de benzoil (la cald) și apoi acid acetic cu 10% H_2SO_4 (după răcire): se obține o colorație verde. Înlocuirea acidului sulfuric cu acid fosforic permite identificarea digitalicelor (fluorescență).

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL I.19 *(continuare)*

Denumirea reacției	Reactivi; mersul analizei, specificitate
Zimmermann (1936)	Se aplică cetosteroizilor cu gruparea C=O învecinată cu o grupare metilenică activă (deci CO în 3 sau 17). Se utilizează compuși dinitroaromatici sau aldehide aromatice. Reacția este dată și de glucozizii cardiotonici care au în C_1 un ciclu lactonic (colorație roșie sau albastră cu compușii dinitroaromatici)
Legal	Este pozitivă cu soluțiile piridinice ale glucozizilor sau geninele lor, dînd o colorație roșie-roză cu NaOH 10% + nitroprusiat de sodiu 0,03%
Baljet	Digitalina în prezența acidului picric în mediu alcalin dă colorație roșie-portocalie
Sanchez (1936)	Soluția acetică de heterozid cu HCl ce conține 3% vanilină, încălzită și adăugînd acid acetic dă colorație albastră
Warren, Howland, Green (1948)	Soluția hidroalcoolică a digitalinei cu naftochinonsulfonat de Na și NaOH 0,2 n dă o colorație roșie ce virează la galben prin adăugare de acid acetic
Arreguine, Pasqualis (1945)	Digitalina cu acid acetic ce conține 1% HCl și cîteva mg xanthidrol, dă prin încălzire o colorație roșie intensă

Scanned with OKEN Scanner

1.3. PROTEINELE (PROTIDELE)

Proteinele sînt componenţi de o deosebită importanţă fiind universal şi obligatoriu răspîndiţi în materia vie, servind în structurare, cataliză, reglări metabolice, procese contractile, imunologice etc.

Clasificare. Denumirea de *proteine, protide, substanţe proteice* reuneşte compuşii formaţi din α-aminoacizi, legaţi între ei prin *legături peptidice :* —CO—HN—. Ele se clasifică în 2 grupe principale: *a.* **proteinele simple** sau **holoproteinele,** alcătuite numai din aminoacizi, din care fac parte: *peptidele,* care pot fi *oligopeptide* (cu molecula mică: 2—8 aminoacizi) şi *polipeptidele* (gr. mol. pînă la 10.000) şi *holoproteinele propriu-zise,* şi *b.* **proteinele complexe** sau **heteroproteidele,** care conţin şi o parte neproteică, numită *grupare prostetică,* pe baza căreia se face clasificarea lor, de exemplu, *glucoproteide* (cu polizaharide), *nucleoproteide* (cu acizi nucleici), *cromoproteide* (cu molecule colorate), *fosfoproteide.* Molecula proteinelor prezintă *nivele diferite de organizare :* structura primară, secundară, terţiară, cuaternară, de mare interes biologic (vezi 1.3.4.).

1.3.1. AMINOACIZII

Prin *hidroliza* completă a proteinelor se obţin aproximativ 20 de feluri de α-aminoacizi (cu excepţia prolinei şi HO-prolinei care sînt α-iminoacizi) şi care reprezintă *unităţile structurale ale proteinelor.* Ei pot fi *alifatici* şi *ciclici ;* subclasificarea ţine seama de numărul atomilor de C (C_2—C_6) ; de numărul grupărilor —NH_2 şi —COOH: monoaminoacizi, diaminomonoacizi, diacizi monoaminaţi, diaminodiacizi; de eventuala existenţă a unor funcţiuni secundare: oxiaminoacizi, tioaminoacizi *(tabelul 1.20)*

1.3.1.1. NOMENCLATURĂ ŞI SIMBOLURI

— Toţi aminoacizii fiind de formă α, această caracteristică nu se notează, dar se arată cînd există alte forme de legare, de exemplu, în tripeptidul *glutation* este implicată gruparea γ: γ-Glu-Cis-Gli

— Simbolurile utilizate sînt din 3 litere *(tabelul 1.20) ;* cele cu o singură literă nu se folosesc în biochimie, dar servesc în studiile secvenţei aminoacizilor din proteine, pentru computerizare.

— Izomerii naturali, fiind aproape fără excepţie de forma L, nu se notează; cînd apar alte forme, D sau DL, se indică de exemplu, D-alanina sau D-Ala; cînd există un al doilea centru de stereoizomerie (pentru stereoizomerul formei naturale) se va utiliza simbolul *-allo,* de exemplu, L- şi D-treonina şi stereoizomerii acestora, D-allotreonina şi L-allotreonina.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.20

Formulele, denumirile şi simbolurile aminoacizilor componenţi ai proteinelor

I ACIZI AMINAŢI ALIFATICI ŞI DERIVAŢII LOR

Numărul atomilor de carbon

C_2

CH_2-CH_2
|
$COOH$

Glicocol, glicina
(ac α-amino-acetic) Gli

C_3

	Aminoacizi hidroxilaţi	Aminoacizi cu sulf	
CH_3	CH_2-OH	CH_2-SH	$CH_2-S-S-CH_2$
$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$ $CH-NH_2$
$COOH$	$COOH$	$COOH$	$COOH$ $COOH$
Alanina	Serina	Cisteina	Cistina
(ac α-NH_2-propionic)	(β-OH-alanina)	(α-NH_2-β-tio-propionic)	[di-(β-tio-α-NH_2-propionic)]
Ala	Ser	Cis	Cis – pt jumătate din molecula

C_4

CH_3	CH_3	CH_2-SH	CH_2-S-CH_3	Diacizi	Amide
CH_2	$CH-OH$	CH_2	CH_2	$COOH$	$CO-NH_2$
$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	CH_2	CH_2
$COOH$	$COOH$	$COOH$	$COOH$	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$
				$COOH$	$COOH$
Butalanina	Treonina	Homocisteina	Metionina	Ac aspartic	Aspargina
(ac α-NH_2-butiric)	(ac α-NH_2-β-OH-butiric)	(ac α-NH_2-γ-tio-butiric)	(ac α-NH_2-γ-metil-tio-n-butiric	(ac α-NH_2-succinic)	Asp-NH_2 sau
Abu	Thr		Met	Asp	Asn

C_5

		Bazici şi derivaţi			
H_3C CH_3	CH_3	CH_2-NH_2	$-NH-C(=O)-NH_2$	$COOH$	$CO-NH_2$
CH	CH_2	CH_2	Citrulina	CH_2	CH_2
$CH-NH_2$	CH_2	CH_2	(δ-carbamido-α-amino-valerianic)	CH_2	CH_2
$COOH$	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	Cit	$CH-NH_2$	$CH-NH_2$
	$COOH$	$COOH$	$-NH-C(=NH)-NH_2$	$COOH$	$COOH$
Valina	Norvalina	Ornitina	Arginina	Glutamic	Glutamina
(α-NH_2-izo-valerianic)	(α-NH_2-valerianic)	(α-, δ-diamino-valerionic)	(δ-guanidil-α-amino-valerianic)	(ac α-amino-glutaric)	Glu-NH_2 sau
Val	Nva	Orn	Arg	Glu	Gln

C_6

			Hidroxilaţi
H_3C CH_3	CH_3	NH_2	NH_2
CH	CH_2 CH_3	CH_2	CH_2
CH_2	CH	CH_2	$H-C-OH$
$CH-NH_2$	$CH-NH_2$	CH_2	CH_2
$COOH$	$COOH$	CH_2	CH_2
		$CH-NH_2$	$CH-NH_2$
		$COOH$	$COOH$
Leucina	Izoleucina	Lizina	Hidroxilizina
(α-NH_2-izocaproic)	(α-NH_2-β-metil-valerianic)	(α-ε-diamino-caproic	(α-ε-diamino-5-(δ)-OH-caproic)

Scanned with OKEN Scanner

Formulele, denumirile şi simbolurile aminoacizilor componenţi ai proteinelor

1 ACIZI AMINAŢI ALIFATICI ŞI DERIVAŢII LOR

Numărul atomilor de carbon

C_2

CH_2-CH_2 (COOH)

Glicocol, glicina (ac α-amino-acetic) **Gli**

C_3

$CH_3-CH(NH_2)-COOH$

Alanina (ac α-NH_2-propionic) **Ala**

Aminoacizi hidroxilaţi

$CH_2(OH)-CH(NH_2)-COOH$

Serina (β-OH-alanina) **Ser**

Aminoacizi cu sulf

$CH_2(SH)-CH(NH_2)-COOH$

Cisteina (α-NH_2-β-tio-propionic)

$CH_2-S-S-CH_2$ ($CH(NH_2)-COOH$)$_2$

Cistina [di-(β-tio-α-NH_2-propionic)]

Cis – pt jumătate din molecula

C_4

$CH_3-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Butalanina (ac α-NH_2-butiric) **Abu**

$CH_3-CH(OH)-CH(NH_2)-COOH$

Treonina (ac α-NH_2-β-OH-butiric) **Thr**

$CH_2(SH)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Homocisteina (ac α-NH_2-γ-tio-butiric)

$CH_2(S-CH_3)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Metionina (ac α-NH_2-γ-metil-tio-n-butiric) **Met**

Diacizi

$COOH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Ac aspartic (ac α-NH_2-succinic) **Asp**

Amide

$CO(NH_2)-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Aspargina $Asp-NH_2$ sau **Asn**

C_5

$(H_3C)_2CH-CH(NH_2)-COOH$

Valina (α-NH_2-izo-valerianic) **Val**

$CH_3-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Norvalina (α-NH_2-valerianic) **Nva**

Bazici şi derivaţi

$CH_2(NH_2)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Ornitina (α-, δ-diamino-valerionic) **Orn**

Citrulina (δ-carbamido-α-amino-valerianic)

$-NH-C(=O)-NH_2$

Cit

Arginina (δ-guanidil-α-amino-valerianic) **Arg**

$-NH-C(=NH)-NH_2$

$COOH-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Glutamic (ac α-amino-glutaric) **Glu**

$CO(NH_2)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Glutamina $Glu-NH_2$ sau **Gln**

C_6

$(H_3C)_2CH-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

Leucina (α-NH_2-izocaproic) **Leu**

$CH_3-CH_2-CH(CH_3)-CH(NH_2)-COOH$

Izoleucina (α-NH_2-β-metil-valerianic) **Ile**

$NH_2-(CH_2)_4-CH(NH_2)-COOH$

Lizina (α-ε-diamino-caproic **Liz**

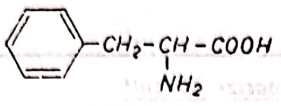
Hidroxilaţi

$NH_2-CH_2-CH(OH)-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$

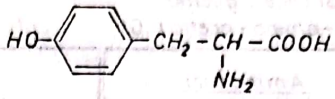
Hidroxilizina (α-ε-diamino-5-(δ)-OH-caproic) **Hil**

TABELUL I.20 *(continuare)*

II ACIZI AMINAȚI CICLICI

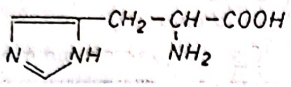


Fenilalanina
(ac. β-fenil-α-amino-propionic)
Phe

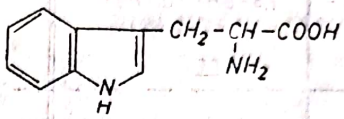


Tirozina
(ac β-p-hidroxi-fenil-α-amino-propionic)
Tir

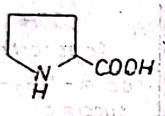
III. ACIZI AMINAȚI HETEROCICLICI



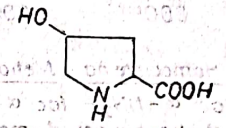
Histidina
ac β(4)-imidazolil-α-amino-propionic)
His



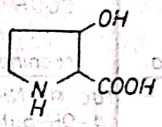
Triptofanul
(ac β(3)-indol-α-amino-propionic)
Trp



Prolina
(ac α-pirolidin-carboxilic)
Pro



Hidroxiprolina
(ac γ-OH-α-pirolidin-carboxilic)
Hip (Hipro)



3-hidroxiprolina
(ac 3-OH-α-pirolidin-carboxilic
3-Hip (3-Hipro)

— Radicalii se denumesc prin sufixul *-il*, de exemplu, de la alanină, *alanil*. În cazul unor aminoacizi pot apare mai multe feluri de radicali, de exemplu, în cazul acidului glutamic (și glutaminei) :

α-glutamil : $HOOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-CO-$
γ-glutamil : $-OC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-COOH$
glutamoil : $-OC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-CO-$
glutaminil : $H_2NOC-CH_2-CH_2-CH(NH_2)-CO-$

— După poziția, într-un lanț peptidic, apar posibilități diferite de legare a aminoacizilor, astfel de exemplu, pentru glicină (glicocol) :

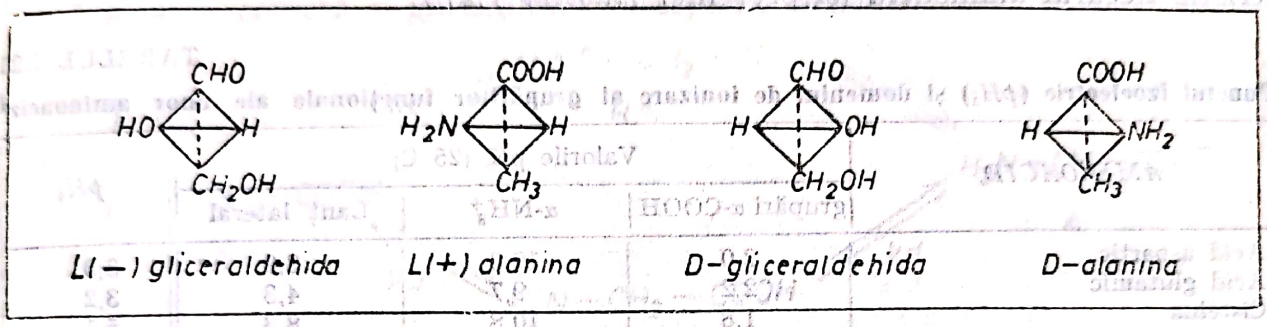
Gli : H_2N-CH_2-COOH : aminoacidul ca atare și formele disociate
Gli : H_2N-CH_2-CO- : arată lipsa unui OH din gruparea $-COOH$.
În structura peptidelor se găsesc de obicei în capătul N-terminal (capătul care începe cu aminoacidul cu grupare NH_2 liberă; se obișnuește să se scrie la stînga).
$-Gli$: $-NH-CH_2-COOH$: lipsa unui H din gruparea aminică; se găsesc de obicei în capătul C-terminal (la dreapta).
$>Gli$ sau $-Gli-$: $=N-CH_2-COOH$; lipsa a doi H de la gruparea aminică.
$-Gli-$: $-NH-CH_2-CO-$ lipsa unui H de la gruparea aminică și a OH de la gruparea carboxilică; reprezintă moleculele din lanț legate în ambele părți prin legături peptidice (majoritatea în peptide).

| | | | |
Lis sau *Asp* sau *Cis* sau *Trp* : o linie deasupra (sau dedesubtul) simbolului arată lipsa H sau OH din lanțul lateral al peptidelor, de exemplu, *Lis* cu a 2-a grupare aminică sub forma $-NH-$; *Asp* cu gruparea $-COOH$ din γ sub forma $-CO-$; *Trp* cu lipsa H de la N din ciclu ; *Cis*, cu lipsa H de la gruparea $-SH$. Deci ele arată substituiri și legături diferite de cele din lanțul peptidic principal ($-CO-HN-$) formate între α-aminoacizi.

— Pentru *derivații* aminoacizilor se folosesc simbolurile uzuale din chimia organică, de exemplu, N-acetilglicina se notează cu Ac—Gli sau Ac.Gli; glicin-etilesterul, cu Gli—OEt; N-etil—N-metilglicina cu $\begin{matrix}\text{Et}\\\text{Me}\end{matrix}\!\!>$Gli; benzoilglicina (acidul hipuric) cu Bz—Gli etc.

1.3.1.2. PROPRIETĂȚILE AMINOACIZILOR

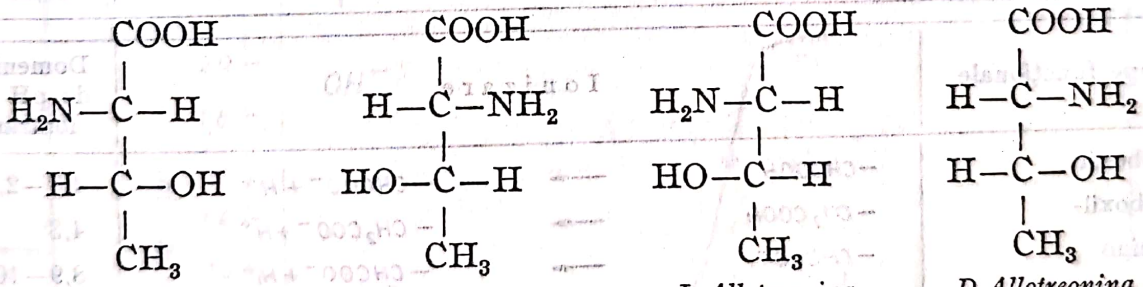
Activitate optică. Izomeri. Toți aminoacizii din proteine (cu excepția Gli) sînt *optic activi*. Configurația lor se stabilește prin comparație cu a gliceraldehidei; simbolurile D și L, și (+) și (—) au aceeași semnificație ca la glucide *(vezi 1.1.2)*:



L(—) gliceraldehida *L(+) alanina* *D-gliceraldehida* *D-alanina*

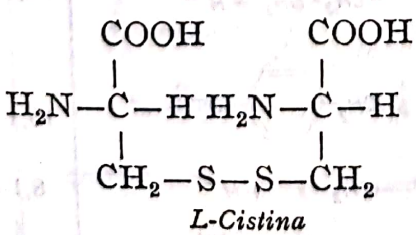
Aminoacizii din proteine sînt L; formele D apar foarte rar, în peretele celulei bacteriilor, în celula canceroasă, în structura unor antibiotice (bacitracina, gramicidina, actinomicina).

Unii aminoacizi au și un al doilea centru de asimetrie, de exemplu, treonina, izoleucina, hidroxiprolina, hidroxilizina, cistina etc. Treonina prezintă astfel patru diastereoizomeri, dintre care doi sînt naturali: L, și D-treonina și doi (de sinteză) notați cu *allo-*:

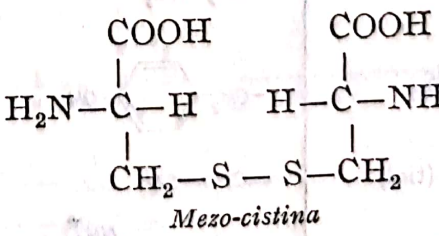


L-Treonina (Thr) — *D-Treonina* (D-Thr) — *L-Allotreonina* (L-allo-Thr) — *D-Allotreonina* (D-allo-Thr)

Cistina are doi centri de asimetrie identici și apar astfel izomeri în care unul din centri e „imaginea în oglindă" a celuilalt, rezultînd forme optic inactive, compensate intern:



L-Cistina



Mezo-cistina

Disocierea aminoacizilor. Caracterul amfoter. Punctul izoelectric. Toți aminoacizii au minimum două grupări implicate în reacția din soluțiile apoase: gruparea

carboxilică cu valoarea pK_a (pH-ul la care gruparea considerată este „jumătate" disociată) în domeniul de pH 2—3 şi gruparea aminică (alfa) cu pK în jur de 10. În general, la pH între 4—9, aminoacizii există ca *ioni dipolari* („amfioni", „ioni amfoteri"), stabilindu-se un echilibru în soluţie:

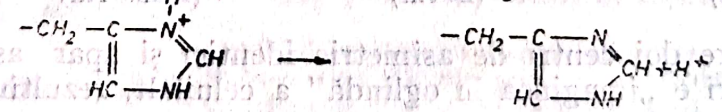
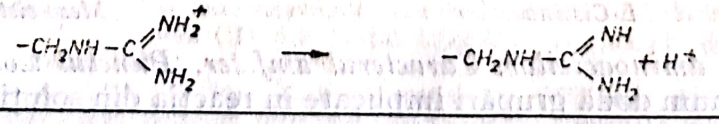
$$\underset{\text{„cation"}}{H_3^+N-CH(R)-COOH} \rightleftharpoons \underset{\text{„ion amfoter"}}{H_3^+N-CH(R)-COO^-} \rightleftharpoons \underset{\text{„anion"}}{H_2N-CH(R)-COO^-}$$

pH-ul la care disocierea acidă este egală cu cea bazică şi cînd aparent nu se manifestă nici o încărcare, reprezintă *punctul izoelectric*, notat cu pH_i, caracteristic fiecărui aminoacid (şi proteine) *(tabelul 1.21)*.

TABELUL 1.21

Punctul izoelectric (pH_i) şi domeniul de ionizare al grupărilor funcţionale ale unor aminoacizi

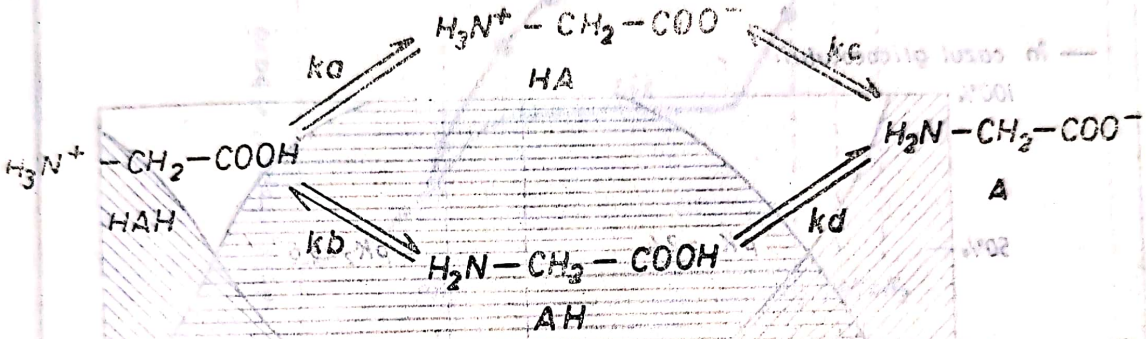
AMINOACID	Valorile pK (25 °C)			pH_i
	grupări α-COOH	α-NH_3^+	Lanţ lateral	
Acid aspartic	2,0	10,0	3,9	3,0
Acid glutamic	2,2	9,7	4,3	3,2
Cisteina	1,8	10,8	8,3	5,1
Serina	2,1	9,2		5,7
Tirozina	2,2	9,1	10,9	5,7
Triptofan				5,9
Leucina				6,0
Glicocol	2,4	9,8		6,1
Alanina				6,8
Histidina	1,8	9,2	6,0	7,6
Lizina	2,2	9,2	10,8	9,35
Arginina	1,8	9,0	12,5	10,35

Grupe funcţionale	Ionizare	Domeniul de pH al ionizării
α-Carboxil-	$-CHCOOH \longrightarrow -CHCOO^- + H^+$	1,7—2,6
γ-Carboxil-	$-CH_2COOH \longrightarrow -CH_2COO^- + H^+$	4,3
α-Amino	$-CHCOO^- \longrightarrow -CHCOO^- + H^+$ ($NH_3^+ \rightarrow NH_2$)	8,9—10,7
Imidazol- (Histidină)		6,1
ε-Amino (Lizină)	$-CH_2-NH_3^+ \longrightarrow -CH_2-NH_2 + H^+$	10,5
—OH fenolic (Tirozină)		10,1
—Sulfhidril-(tiol)	$-CH_2-SH \longrightarrow -CH_2-S^- + H^+$	8,1—8,3
Guanidină- (Arginină)		12,5

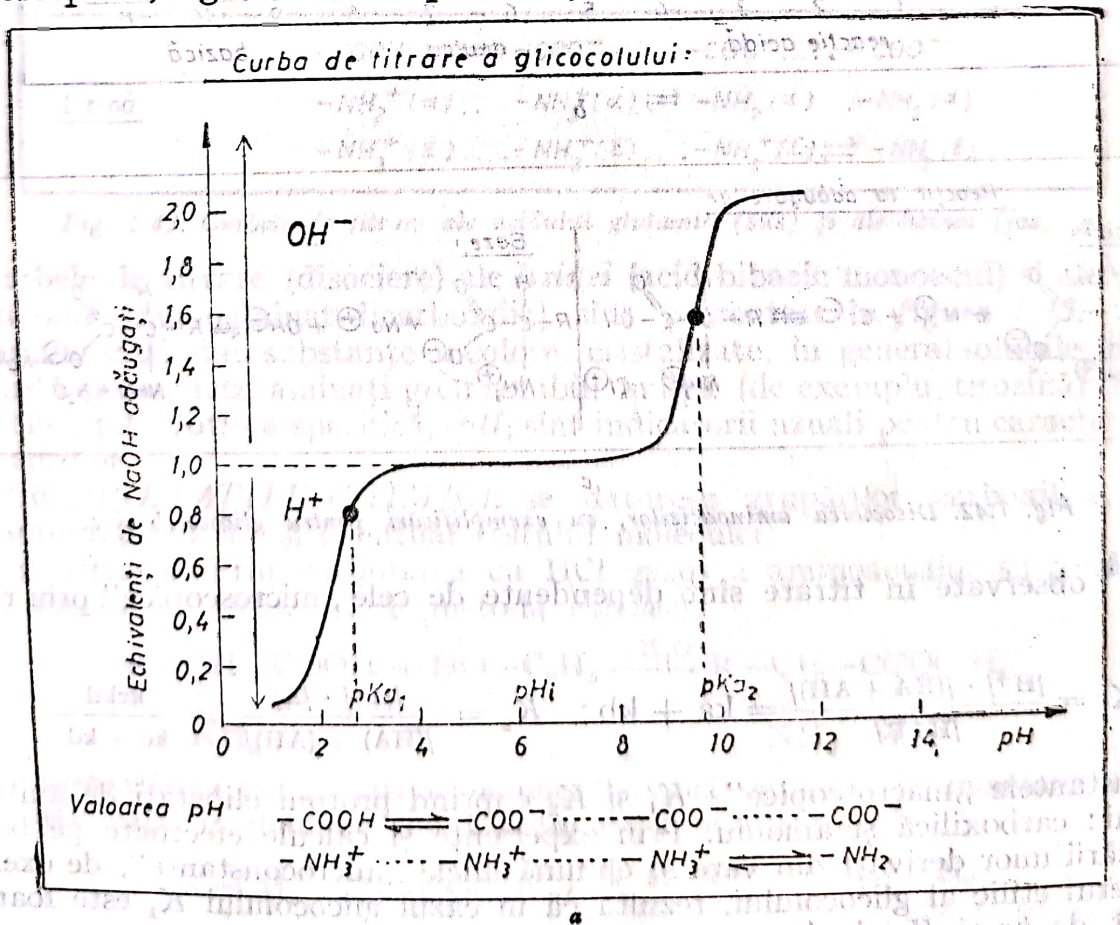
Aminoacizii cu o grupare acidă și una bazică, au pH_i situat aproximativ la mijloc între valoarea pK_a a grupării acide și a celei aminice: $pH_i = \frac{pK_a^{-NH_3} + pK_a^{-COOH}}{2}$ în special în domeniul ușor acid, deoarece și restul moleculei influențează pH_i; când aminoacidul are grupări adiționale, acide sau bazice, pH_i va fi în domeniul mai acid, respectiv mai bazic, după natura acestora.

Curba de titrare a unui aminoacid reflectă comportarea grupărilor sale ionizabile; grupele —COOH și $—NH_2$ se deosebesc prin valorile pK (teoria lui *Brönsted* cu privire la disocierea electrolitică). În cazul *glicocolului (figura 1.42)*, curba este caracterizată prin două domenii de disociere: $pKa_1 = 2{,}35$, ce corespunde ionizării grupării carboxilice și $pKa_2 = 9{,}78$, pentru gruparea aminică.

Ionizarea corectă a glicocolului corespunde schemei:



și implică *patru* constante de disociere: ka, kb, kc, kd, definite ca disocieri „microscopice", legate între ele prin relația: kakc = kbkd; constantele „macro-



a

Fig. 1.42. Disocierea aminoacizilor a.

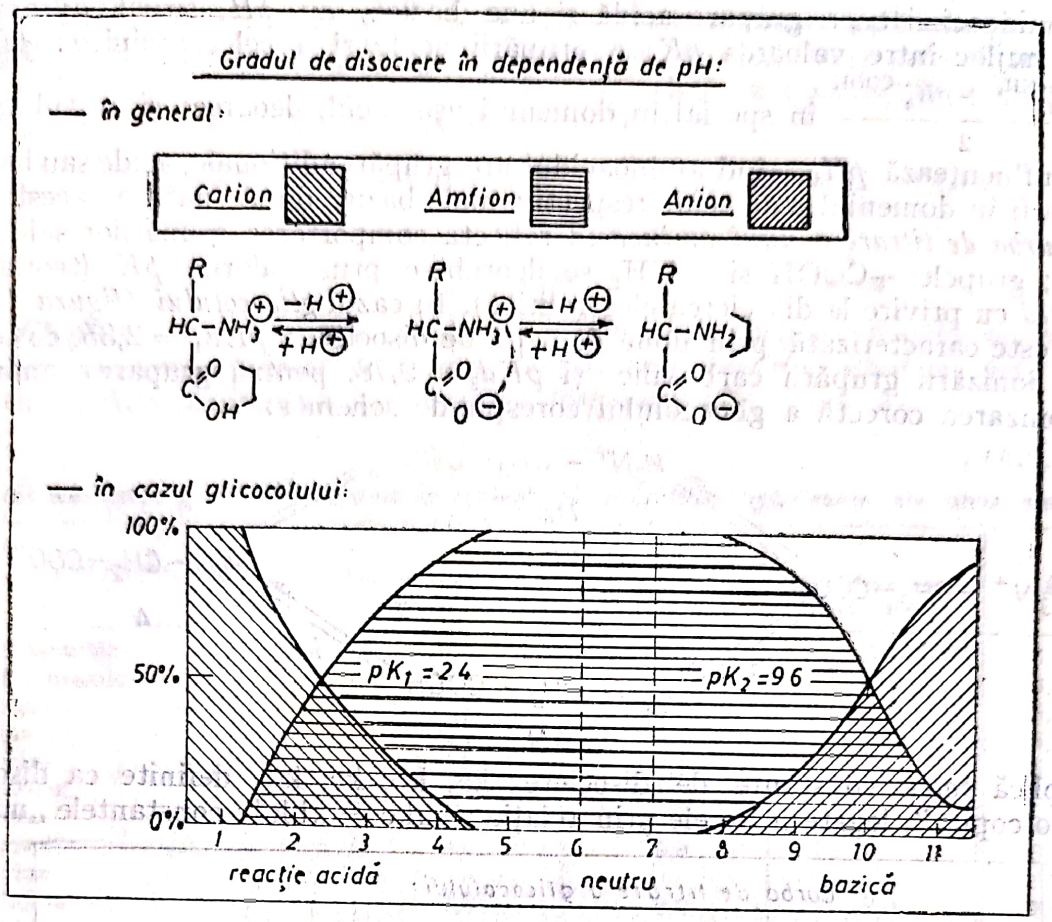


Fig. 1.42. Disocierea aminoacizilor, cu exemplificări pentru glicocol b și c.

scopice" observate în titrare sînt dependente de cele „microscopice" prin relațiile:

$$K_1 = \frac{/H^+/ \cdot /(HA + AH)/}{/HAH/} = ka + kb\,; \quad K_2 = \frac{/H^+/ \cdot /A/}{/(HA) + (AH)/} = \frac{kckd}{kc + kd}$$

Constantele „macroscopice": K_1 și K_2 cuprind protoni eliberați de ambele funcțiuni: carboxilică și amoniu. Prin experiențe și calcule efectuate pe baza comportării unor derivați din care se elimină unele „microconstante", de exemplu, esterul etilic al glicocolului, rezultă că în cazul glicocolului K_1 este foarte apropiat de *ka* și K_2 de *kc*.

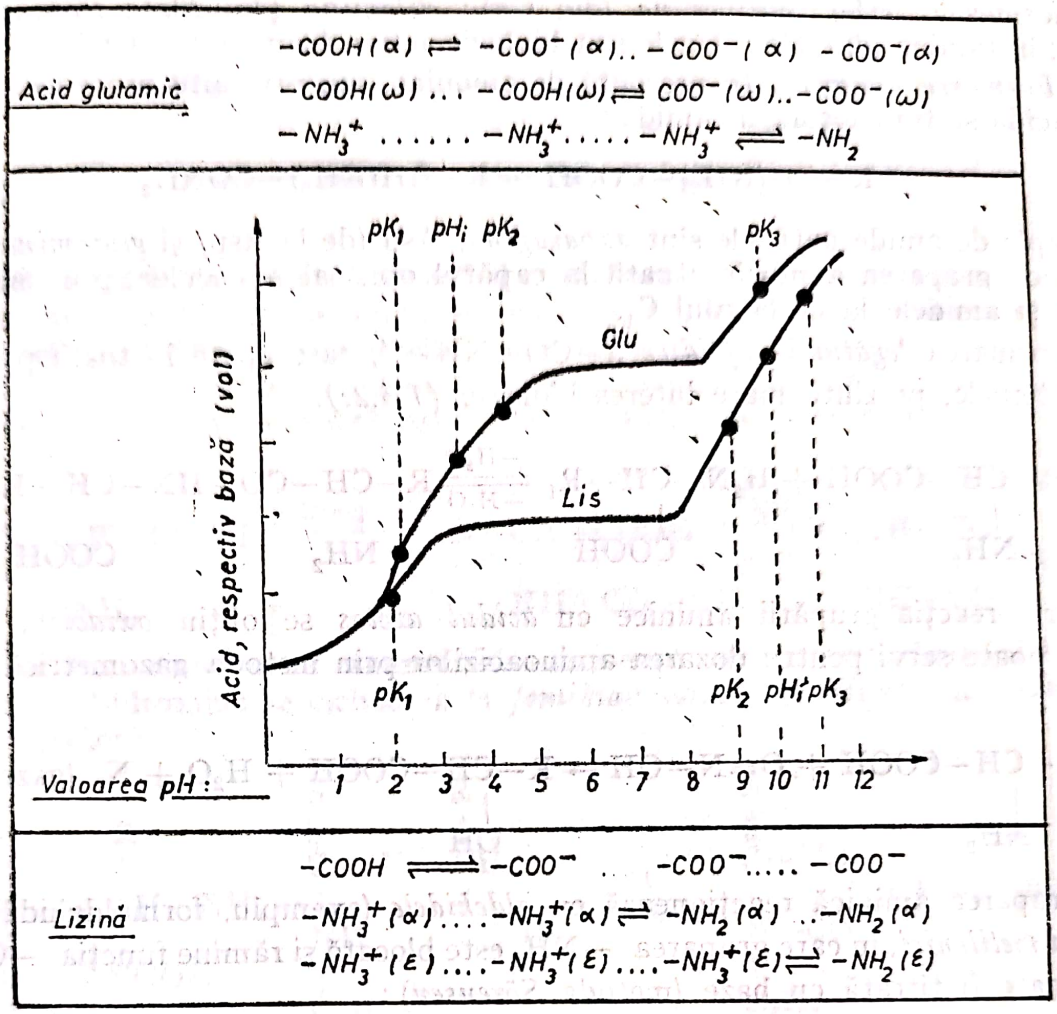


Fig. 1.43. Curbele de titrare ale acidului glutamic (sus) şi ale lizinei (jos)

Curbele de titrare (disociere) ale *lizinei* (acid bibazic monoacid) şi ale *acidului glutamic* (monoaminat-dicarboxilic) sînt prezentate în *figura 1.43.*

Aminoacizii sînt substanţe incolore, cristalizate, în general solubile în apă, dar există şi unii acizi aminaţi greu solubili în apă (de exemplu, tirozina). Forma cristalelor, p.t., rotirea specifică, pH_i sînt indicatorii uzuali pentru caracterizarea aminoacizilor.

PROPRIETĂŢILE CHIMICE se datoresc grupărilor carboxilice, aminice, interacţiunii lor şi eventual restului moleculei.

Esterificarea. Prin barbotarea cu HCl gazos a aminoacizilor suspendaţi în alcool absolut se obţin esteri (metoda *Fischer*):

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + HO-C_2H_5 \xrightarrow{-H_2O} R-\underset{\displaystyle NH_2 \cdot HCl}{\underset{|}{CH}}-COOC_2H_5$$

Decarboxilarea aminoacizilor monocarboxilici conduce la monoamine şi a celor diaminaţi, la diamine (cu 1 atom de C mai puţin):

$$R-CH_2-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH \xrightarrow{-CO_2} R-CH_2-CH_2-NH_2$$

Scanned with OKEN Scanner

Se formează astfel: *metilamina* (din Gli); *etilamina* (din Ala); *tiramina* (din Tir); histamina (din His). Unele sînt biologic active („amine biogene").

Formarea amidelor. În prezență de amoniac, sau prin alte procedee, gruparea acidă se transformă în amidă:

$$R{-}CH(NH_2){-}COOH \rightarrow R{-}CH(NH_2){-}CONH_2$$

Exemple de amide naturale sînt *asparagina*, Asn (de la Asp) și *glutamina* (de la Glu), cu gruparea amidică situată la capătul opus al moleculei; prin sinteze se obțin și amidele la carboxilul C_1.

Formarea *legăturii peptidice* „—CO—NH—", care apare în toate peptidele și proteinele, prezintă mare interes biologic *(1.3.2.)*.

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + H_2N{-}\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}{-}R_1 \underset{+H_2O}{\overset{-H_2O}{\rightleftharpoons}} R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}CO{-}HN{-}\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}{-}R_1$$

Prin reacția grupării aminice cu *acidul azotos* se obțin *oxiacizi;* azotul ormat poate servi pentru dozarea aminoacizilor prin metoda gazometrică *(Van Slyke)*:

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + O{=}N{-}OH \rightarrow R{-}\underset{\displaystyle OH}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + H_2O + N_2 \uparrow \text{(gazos)}$$

Gruparea aminică reacționează cu *aldehidele* (exemplu, formaldehidă) dînd *derivați metilenici*, în care gruparea $-NH_2$ este blocată și rămîne funcția $-COO^-$ care poate fi titrată cu baze (metoda *Sörensen*):

$$R{-}\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH + O{=}CH_2 \xrightarrow{-H_2O} R{-}\underset{\displaystyle N{=}CH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COOH \xrightarrow{+NaOH} R{-}\underset{\displaystyle N{=}CH_2}{\underset{|}{CH}}{-}COONa$$

Metilarea aminoacizilor. Aminoacizii reacționează cu agenții de metilare (sulfat de metil, iodură de metil etc.) formînd *betaine*, derivați cu azot cuaternar:

$$R{-}\underset{\displaystyle COO^-}{\underset{|}{CH}}{-}N^+ \equiv (CH_3)_3 \quad \text{sau} \quad R{-}\underset{\displaystyle CO{-}O}{\underset{|}{CH}}{-}N \equiv (CH_3)_3$$

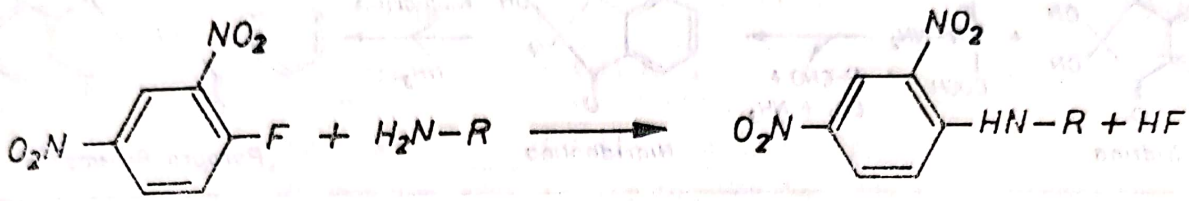
În reacțiile metabolice apar și derivații monometilați, de exemplu, de la glicocol: $HOOC{-}CH_2{-}NH(CH_3)$: metil-glicocol (Me-Gli) sau *sarcozina*.

Acilarea aminoacizilor. Cu cloruri acide, cu anhidridele acide și prin procesele metabolice, aminoacizii pot forma derivați *acilați*: $R{-}\underset{\displaystyle COOH}{\underset{|}{CH}}{-}NH{-}CO{-}R_1{-}$.

Astfel, de la glicină se formează acetilglicina (Ac-Gli); cu acidul benzoic, benzoil-glicina (Bz-Gli) sau *acidul hipuric*.

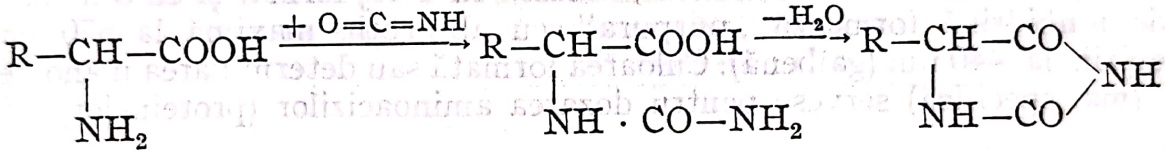
Scanned with OKEN Scanner

Arilarea aminoacizilor. 1-flor-2,4-dinitrobenzenul (FDNB) este un bun agent de arilare al aminoacizilor:

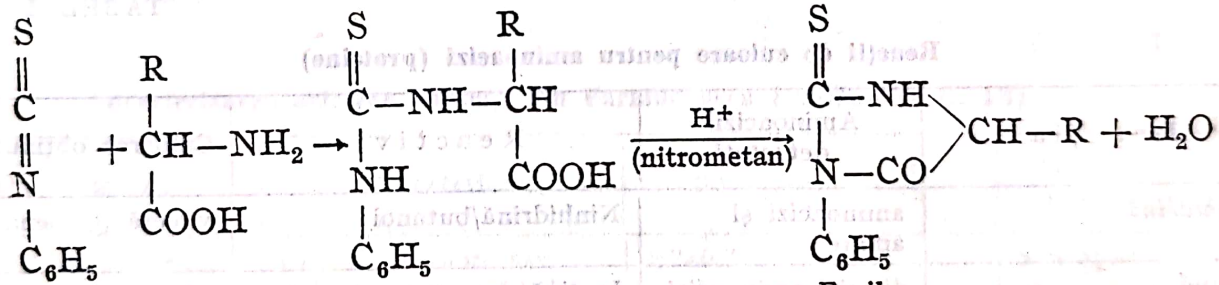


Produşii formaţi, de culoare galbenă şi cristalizaţi, servesc pentru identificarea şi determinarea cantitativă a aminoacizilor, precum şi pentru stabilirea structurii (secvenţei) peptidelor şi proteinelor *(vezi 1.3.4.1.2).*

Formarea hidantoinelor. Prin tratare cu *acid cianic,* sau prin încălzire cu *uree,* acizii aminaţi formează *acizi hidantoinici,* care prin ciclizare dau *hidantoine:*

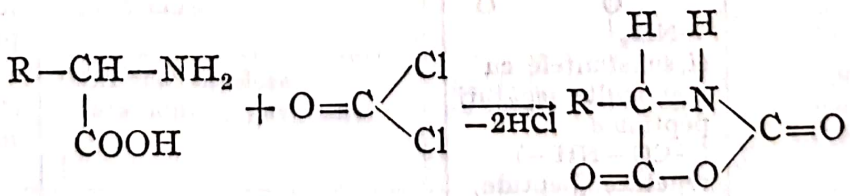


Fenilizotiocianatul cu aminoacizii formează *acizi fenilhidantoinici,* care în solvenţi nehidroxilici se ciclizează la *fenilhidantoine,* valorificate în identificarea aminoacizilor:

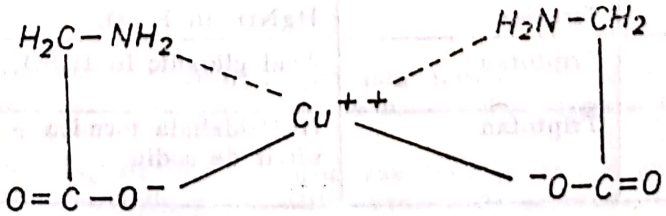


Fenilizotiocianat — *Aminoacid* — *Acid fenilhidantoic* — *Fenil hidantoină*

Fosgenul cu α-aminoacizii dă *N-carboxianhidride,* care reacţionează cu reactivii nucleofili şi sînt intermediari importanţi în formarea unor polimeri:



O reacţie în care participă atît gruparea —COOH cît şi $—NH_2$ este *formarea complecşilor coloraţi* cu diferite săruri, de exemplu, clorura cuprică (coloraţie albastră-închisă), ca în cazul cu glicocolul:



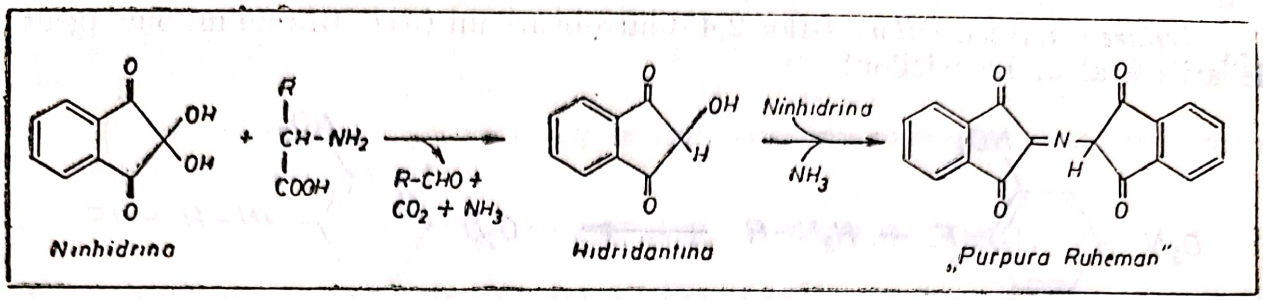


Fig. 1.44. Reacția proteinelor cu ninhidrina

Complexe similare se obțin și cu peptidele (proteinele) și cu alte metale (Co, Ni etc.) servind pentru identificare și dozare.

Reacția cu *ninhidrina* este o reacție de oxido-reducere de mare importanță. Aminoacizii se descompun la aldehidă, CO_2 și NH_3, iar ninhidrina (tricetohidriden-hidrat) se reduce la hidridantină; aceasta cu NH_3 format și cu o nouă moleculă de ninhidrină formează „purpura", cu absorbție maximă la 570 nm; cu iminoacizii, la 440 nm (galbenă). Culoarea formată sau determinarea manometrică a CO_2 (mai specifică) servesc pentru dozarea aminoacizilor (proteinelor) *(figura 1.44)*.

Pentru identificarea și dozarea aminoacizilor și/sau proteinelor se utilizează o serie de reacții de culoare *(tabelul 1.22)*

TABELUL 1.22

Reacții de culoare pentru aminoacizi (proteine)

Reacția	Aminoacizii detectați	Reactivi	Culoarea obținută
Ninhidrină	aminoacizi și amine	Ninhidrină/butanol	violetă (galbenă)
Izatină (2,3-diceto-indolina)	diferiți aminoacizi	Izatină/propanol/ac. acetic	albastru-violetă
Biuretului	biuretul: $H_2N-C(=O)-NH-C(=O)-NH_2$ și substanțele cu mai multe legături peptidice (—CO—NH—) repetate (peptide, proteine)	$CuSO_4$ în mediu alcalin	de la roz la violet, în raport cu mărimea moleculei. Reacție generală pt. proteine
Xantoproteică	Tirozină, triptofan fenilalanina	HNO_3 conc. (fierbere)	galbenă-portocalie (în mediu alcalin se intensifică)
Millon	Tirozină	$HgNO_3$ în HNO_3	roșie
Hopkins-Cole (ac. glioxilic)	Triptofan	Acid glioxilic în H_2SO_4	purpurie-violetă
Adamkiewicz (modificată de Fuhrt-Lieben)	Triptofan	HCl/aldehidă formică + nitrit de sodiu	violetă

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.22 (continuare)

Reacţia	Aminoacizii detectaţi	Reactivi	Culoarea obţinută
Diazo-reacţia Ehrlich—Pauli	Histidina, Tirozina	Acid sulfanilic + Na_2NO_3, apoi Na_2CO_3	portocalie
Folin-Ciocâlteu	Tirozină	Acid fosfomolibdotungstic	albastră
Ehrlich	Triptofan	p-dimetil-amino-benzaldehidă în HCl	castanie
Sakaguki	Arginină	α-naftol şi NaOCl	roşie
Nitroprusiat	Cisteina	Nitro rusiat de Na în NH_3 diluat	roşie
Sullivan	Cisteină	1,2-naftochinon-4-sulfonat de sodiu în hidrosulfură de sodiu	roşie
Acetat de Pb	aminoacizi cu sulf	fierbere cu NaOH + acetat de Pb (saturat)	brună-neagră

1.3.1.3. AMINOACIZI UTILIZAŢI ÎN TERAPIE

F.R.IX prevede acidul glutamic şi clorhidratul său şi metionina iar F.R.VIII prevedea glicocolul *(tabelul 1.23)*.

TABELUL 1.2

Caracterizarea acizilor aminaţi din Farmacopeea Română (F.R. IX).

Denumire	Caracterizare	p.t.	$(\alpha)_D^{20}$	*Solubilitate* 1 p se solvă în
ACIDUM AMINOACETICUM (Glicocol; glicină) (F.R. VIII)	Cristale incolore sau pulbere cristalină albă. La aer şi lumină se colorează	≈240°C cu desc.		5 p apă; greu sol. alcool insol. în eter
ACIDUM GLUTAMICUM (Acid glutamic)	Pulbere cristalină albă; miros caracteristic; gust acru	≈195°C cu desc.	+29° la +34° (c = 10% în HCl N)	150 p apă; insol. în eter, alcool, cloroform
ACIDI GLUTAMICI HYDROCHLORIDUM (Clorhidratul acidului glutamic)	Cristale incolore; fără miros; gust acru	≈200°C cu desc.	+24° la +26° (c = 10% în HCl N)	1,8 p apă; insol. în alcool, eter
METHIONINUM (Metionină)	Pulbere cristalină albă sau lamele albe strălucitoare; miros slab caracteristic; gust dulceag	≈270°C cu desc.		35 p apă; foarte greu sol. în alcool; insol. în eter şi cloroform

Glicocolul, sol. inj. 10% (1 g/fiolă) este trofic al ţesutului muscular şi vasodilatator coronarian, cu indicaţii în distrofia musculară progresivă, sechelele de poliomielită, angina de piept (adjuvant) şi ca pulbere (extern), topic cutan.

Acidul glutamic (Glutarom) drageuri (0,4 g/drageu) sau fiole (Natr. glutamicum 10%) creşte capacitatea funcţională a scoarţei cerebrale şi detoxifică excesul de amoniac; este recomandat în

Scanned with OKEN Scanner

oligofrenie (fenilpiruvică, prin factor Rh, mixedem, mongolism), nevroză astenică, surmenaj psihic, unele forme de epilepsie; encefalopatia portală, precoma şi coma hepatică.

Multiglutin conţine Natr. glutamicum 2,12 g, Kalium glutamicum 0,04 g, Calcium glutamicum 0,0365 g/fiola de 10 ml. Are efecte de detoxifiere prin fixarea amoniacului, cu aplicaţii în encefalopatia portală, precoma şi coma hepatică.

Acidul aspartic este un protector al parenchimului hepatic. Cercetările efectuate de către *O. Fodor şi colab.*, începînd cu anul 1958, asupra aspartatului şi a asparaginei în soluţie glucozată (perfuzii) relevă un efect protector al aspartatului asupra leziunilor hepatice experimentale produse prin CCl_4 la iepuri, cobai şi şobolani. În clinica umană, perfuzia de asparagină la bolnavii cu hepatită cronică produce ameliorarea stării generale, scăderea asteniei, revenirea poftei de mîncare, estomparea sindromului dispeptic, reducerea hepatomegaliei, creşterea în greutate şi ameliorarea diurezei, în paralel cu tendinţa de normalizare a unor indicatori biochimici alteraţi în hepatita cronică. Astfel, de exemplu, scade sideremia, creşte sintezele proteice (albuminemia, protrombinemia, colinesteraza serică), reduce bilirubinemia, cu creşterea trecerii sale în bilă, reface capacitatea de conjugare (corectează proporţia de diglicuronid al bilirubinei în bila hepatică), corectează clearance-ul bromsulfonftaleinei (BSP). Aspartatul are un efect amoniofixator prin stimularea ureogenezei în diferite forme de hiperamoniemie. În intoxicaţia cu CCl_4, animalele protejate cu aspartat, au în ficat un conţinut mai mare de glicogen, de ARN citoplasmatic şi a unor enzime care favorizează procesele energodependente. Pe această bază a fost elaborat preparatul *„Aspatofort"* (sol. inj., conţinînd d,l-aspartat de sodiu, 250 mg şi piridoxină. HCl, 125 mg/fiolă) cu efect trofic hepatic, detoxifiant al amoniului, indicat în hepatita cronică şi acută, encefalopatie portală, precomă şi comă hepatică.

1.3.1.4. AMINOACIZI NATURALI NEPROTEICI

În afară de cei aproximativ 20 de α-aminoacizi care intră în structura proteinelor *(E. Fischer, 1900)*, aplicarea metodelor moderne a permis identificarea a încă aproximativ 100 aminoacizi, care nu intră în structura proteinelor, dar cu rol important în celulă.

Cei mai mulţi aminoacizi neproteici se găsesc în vegetale, care fiind autotrofe, au o activitate sintetică superioară animalelor. Unii dintre ei nu sînt precursori ai unor constituienţi celulari şi apariţia lor ar fi o consecinţă a mutaţiilor suferite de genom.

Între aminoacizii neproteici apar unii care sînt toxici, ca atare, sau prin metaboliţii pe care îi produc. Astfel, de exemplu, unii din specilile de *Lathyru*, care produc boala *latirism* cu două forme de manifestare: A. *osteolatirismuls* manifestat prin deformări ale scheletului şi leziuni musculare, cauzat de β-*aminopropionitril;* compusul latirogen acţionează asupra elastinei şi colagenului din ţesutul conjunctiv, probabil prin inhibarea enzimei de oxidare a grupării ε-NH_2 a lizinei din colagen. B. *neurolatirismul*, caracterizat prin convulsii şi rigiditate musculară. Din *Lathirus sativus* s-au obţinut două neurotoxine: acidul N-β-oxalil-α, β-diaminopropionic şi acidul α, γ-diaminobutiric.

Alţii au efecte asupra ficatului, cum sînt *hipoglicina A şi B:* β-(metilenciclopropanil)-alanina şi respectiv γ-glutamil-β-(metilenciclopropil)-alanina din *Blighia sapida*. Ele au efecte hipoglicemiante, cu scăderea glicogenului şi acumularea picăturilor de grăsimi (steatoză hepatică); ca mecanism de acţiune se sugerează inhibarea gluconeogenezei din piruvat, deoarece scade NADH şi ATP; de asemenea sînt inhibitori competitivi pentru transaminazele hepatice. Efectul lor toxic poate fi prevenit prin vitamina B_2. O serie de *aminoacizi acilaţi* apar în ţesutul nervos, de exemplu, N-acetil-L-aspartatul (care dispare în timpul activităţii nervoase), ac. N-acetil-glutamic, N-acetil-L-aspartat-α-L-glutamic etc·

Scanned with OKEN Scanner

1.3.2. PEPTIDELE

1.3.2.1. DEFINIŢIE ŞI NOMENCLATURĂ

Peptidele sînt alcătuite din 2 pînă la 80–90 resturi de aminoacizi, uniţi între ei prin legături amidice particulare, denumite peptidice, cu gr. mol. pînă la 10.000 *(C.E.Li)*, dializabile prin membrana de celofan *(R. L. M. Synge, 1949)*, în timp ce *proteinele* au gr. mol. mai mari şi sînt nedializabile. Delimitarea nu este absolută, de exemplu, protaminele, considerate ca proteine, au gr. mol. în jur de 5.000. În cadrul peptidelor se păstrează denumirea de *dipeptide* pentru cele alcătuite din 2 aminoacizi, *oligopeptide*, pentru cele cu 3–8 resturi de aminoacizi şi *polipeptide* pentru cele mai mari. Cele alcătuite exclusiv din aminoacizi se numesc *homeomerice*, iar cele care conţin şi alte tipuri de molecule, *heteromerice*, de exemplu, *depsipeptidele*, formate din acizi aminaţi şi acizi alcooli (corespunzători); ele prezintă, simultan, legături peptidice şi ester (între gruparea –COOH a aminoacidului şi OH a acidalcoolului) *(M. M. Shemykin, 1961)*.

În formularea peptidelor şi proteinelor se recomandă scrierea începînd cu aminoacidul N-terminal (cu gruparea $-NH_2$ liberă), la stînga şi terminînd, la dreapta, cu aminoacidul C-terminal (cu gruparea –COOH liberă). Dacă într-o anumită regiune a moleculei se cunosc aminoacizii, dar nu este stabilită secvenţa lor, aceştia se scriu în paranteză; cînd este necesar se indică şi direcţia legăturii, care pleacă de la CO spre NH, vîrful ei indicînd azotul (exemplu: CO → NH)

Din formula:

$$\underset{1}{\text{Gli}}-\underset{2}{\text{Glu}}-\underset{3}{\text{Arg}}-\underset{4}{\text{Gli}}-\underset{5}{\text{Phe}}-(\text{Phe, Tir, Thr, Pro})-\underset{10}{\text{Lis}}-\underset{11}{\text{Ala}}$$

rezultă că Gli$_1$ are gruparea NH_2 liberă (aminoacid N-terminal) şi Ala$_{11}$ are gruparea –COOH liberă (aminoacid C-terminal); secvenţa primilor 5 şi a ultimilor 2 aminoacizi este cunoscută, dar a celor din poziţiile 6–9 nu este precizată.

Acizii aminaţi naturali fiind aproape în exclusivitate L, acest caracter se subînţelege şi nu se notează, dar cînd apar aminoacizi D sau DL este necesară precizarea, de exemplu, Leu-D-Phe-Gli sau Leu-DL-Phe-Gli.

Faptul că aminoacidul din stînga are $-NH_2$ liber şi cel din dreapta –COOH (I) se poate scoate mai bine în relief prin notarea în stînga a H ce aparţine grupării aminice şi în dreapta a OH din carboxil (II); dacă dorim să arătăm şi starea de disociere, se indică forma cation (III) sau anion (IV), de exemplu, Gli-Val-Thr(I); H-Gli-Val-Thr-OH(II); $^+H_2$-Gli-Val-Thr-OH(III); H-Gli-Val-Thr-O^- (IV).

În mod similar se pot nota şi alte particularităţi, de exemplu

H-Gli-Lis-Gli-OH: glicillizilglicina
(la Lis: | H)

$^+H_2$-Gli-Lis-Gli-OH.2Cl^-: diclorhidratul glicillizilglicinei
(la Lis: | $^+H_2$)

Gli-Lis-Gli-O^-Na^+: sarea de sodiu a glicillizilglicinei

Gli-Lis-Gli sau Gli-Lis(CHO)-Gli: derivatul N-formil al glicillizilglicinei
(la Lis: | CHO)

Substituirile la N_α se pot nota în felul următor:

Gli $\overset{\text{NO}}{\perp}$ Gli: glicil-nitrozo-glicina; Gli $\overset{\text{Ac}}{\perp}$ Gli: glicil-N_α-acetil-glicina; Gli $\overset{\text{Me}}{\perp}$ Gli sau Gli-Me-Gli: glicilsarcozina: $\overset{\text{Gli}}{\text{Gli}}\rfloor$ Gli: $N_\alpha$glicil-N_α-glicilglicina.

Scanned with OKEN Scanner

În cadrul polipeptidelor *ciclice* se face diferențierea între cele în care aminoacizii sînt legați numai prin legături peptidice, denumite *homodetice* și cele care au și alte feluri de legături (de exemplu, —S—S—, ester etc.), *denumite heterodetice.*

Polipeptidele ciclice *homodetice* se pot nota în moduri diferite, de exemplu, decapeptida *Gramicidina S* se poate scrie prin notarea aminoacizilor în paranteză, precedată de particula *ciclo-* (I) sau unind primul aminoacid cu ultimul (II); cînd se scrie pe două rînduri este necesar să se noteze direcția legăturii peptidice prin săgeată (III):

I) *ciclo*-(-Val-Orn-Leu-DPhe-Pro-Val-Orn-Leu-DPhe-Pro-)

II) |-Val-Orn-Leu-DPhe-Pro-Val-Orn-Leu-DPhe-Pro-|

III) |→Val → Orn → Leu → DPhe → Pro —|
|—Pro ← DPhe ← Leu ← Orn ← Val ←|

Dintre polipeptidele ciclice *heterodetice* se poate menționa *oxitocina (a se vedea capitolul Hormoni)* în care ciclizarea se face prin legătura —S—S—(IV) și treonilglicilglicilglicina, cu ciclizarea între —COOH glicinei și —OH treoninei (V):

IV) H_2N—Gli-Leu-Pro-Cis-Glu-Asn-Ile-Tir-Cis
|_____|

V) Thr-Gli-Gli-Gli—| sau H-Thr-Gli-Gli-Gli—|
|_____| |_____|

Dezvoltarea domeniului polipeptidelor naturale și de sinteză a determinat *Uniunea internațională de Chimie pură și aplicată* (IUPAC) și *Uniunea internațională de Biochimie* (IUB) să recomande, prin *Comisia de nomenclatură biochimică* (CNB) și alte reguli. Astfel, de exemplu, se definesc mai multe grupe de *polimeri* (la care aparțin și polipeptidele și proteinele): *liniari* (toți aminoacizii în lanț); *ramificați* (în care unul sau mai multe segmente polimerice se leagă la grupările funcționale dale catenei laterale, ca de exemplu, ε-NH_2, β- sau γ-COOH, atomii de H rămași la legătura α), apărînd astfel una sau mai multe ramificații; *blocuri (asocieri) de polimeri* (în care două sau mai multe segmente liniare sau ramificate se unesc între ele pentru a forma polimeri mai mari). Termenul *segment de polimer* reprezintă un polimer care formează o parte distinctă dintr-un polimer mai mare; segmentele de polimeri liniari se notează cu prefixul *poli-* sau cu indicele *n*, care poate avea valori numerice definite, de exemplu, *poli*-Glu sau $(Glu)_n$, respectiv $(Glu)_{10}$ pentru o decapeptidă formată din 10 molecule de acid glutamic. Ramificările se notează prin linii verticale sau în unghi. O linie orizontală la dreapta sau la stînga unui aminoacid reprezintă legăturile normale între α-NH_2 și α-COOH; o linie verticală deasupra liniei orizontale, ce leagă doi aminoacizi arată că legătura se face prin atomii de H rămași la legătura peptidică; o linie verticală, la prima literă din simbolul aminoacidului, indică implicarea altor funcțiuni, de exemplu, o a doua grupare —NH_2 sau —COOH a aminoacidului, legat prin funcțiunile sale α în legătura peptidică.

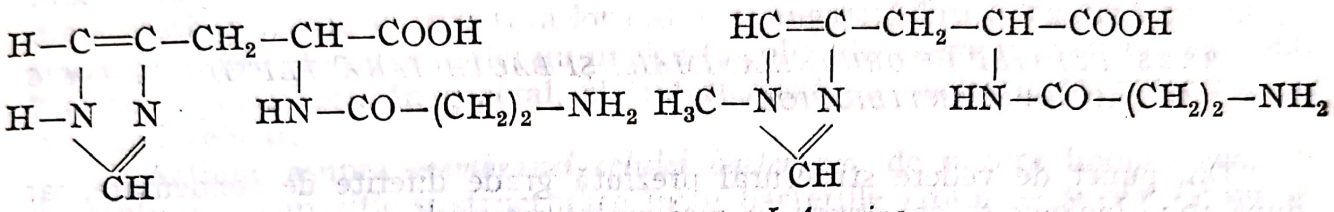
În cazul unor modificări pe structura unei peptide, care are un nume uzual, apar diferite formulări: înlocuirea de exemplu, în vasopresină a celui de al 8-lea aminoacid cu citrulina se va nota cu [8-citrulin]-vasopresina sau [Cit^8]-vasopresina. Extinderea (lungirea) unei peptide X, cu unul sau mai mulți aminoacizi, se va indica, în cazul în care are loc *la capătul N-terminal*, prin numele sau simbolul aminoacidului (sau aminoacizilor), urmat de numele peptidei, de exemplu, alungirea cu o valină a peptidei X se va arăta prin Valil-X sau Val-X; cu doi aminoacizi (Val, Gli): Valilglicil-X sau Val-Gli-X, iar cînd are loc *la capătul C-terminal* se va scrie numele peptidei, urmat de particula -il- și apoi aminoacidul (sau aminoacizii) adăugați, de exemplu, X-il-leucina sau X-il-Leu. Cînd se inserează în lanț unul sau mai mulți aminoacizi se notează prin prefixul *endo-*, numărul aminoacidului la care se face inserția (notat cu a), sau dacă sînt mai mulți aminoacizi, cu a, b... și la sfîrșit numele peptidei, de exemplu, dacă în peptida X, după aminoacidul al 4-lea se introduce treonina și după al 6-lea valina și glicina, se va scrie: endo-4a-treonina, 6a-valina, 6b-glicin-X sau endo-Tre^{4a}, (Val^{6a}-Gli^{7b})-X. Îndepărtarea unuia sau a mai multor aminoacizi se notează cu prefixul *des-* (sau *dez-*), de exemplu eliminarea prolinei din poziția 7 a oxitocinei se notează cu des-7-prolin-oxitocina sau des-Pro^7-oxitocina.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.2.2. PEPTIDE NATURALE

1.3.2.2.1. *DIPEPTIDE*

Cele mai simple peptide (dipeptide) cunoscute de mult timp sînt *carnozina*, izolată din mușchii mamiferelor (*Gulevici*, 1900), alcătuită din histidină și β-alanină, și *anzerina*, din mușchii păsărilor (Ackermann, 1929), care conține în locul His, metil-His:

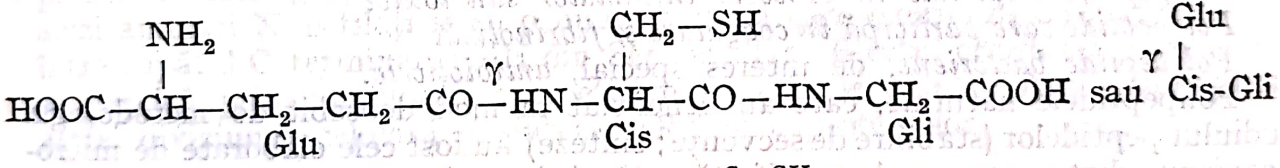


L-Carnozina (β-alanil-L-histidina)

L-Anzerina (β-alanil-L-1-metil-histidina)

1.3.2.2.2. *TRIPEPTIDE*

Glutationul s-ar putea forma, teoretic, prin legarea Glu, Cis și Gli, cu eliminarea a 2 molecule de apă. În realitate, sinteza de laborator are loc în etape, cu blocarea și activarea succesivă a diferitelor grupări, și în celulă prin mecanismele biosintezei proteinelor. Este de semnalat că în legarea cu Cis, participă gruparea γ-COOH a Glu:



Glutation redus sau G—SH

Dozarea G-SH se poate face iodometric (oxidarea grupării-SH la —S—S—), colorimetric (cu nitroprusiat sau cu aloxan, cînd se formează un compus cu maximul de absorbție la 305 nm), prin titrare amperometrică sau enzimatic, glutationul fiind un activator al *glioxilazei* care transformă metilglioxalul în acid lactic. Se găsește (mg/100 g) în sînge total de șobolan: 60; de iepuri: 49; ficat: 145—175; splină: 76—118; inimă: 64—67; mușchi: 26; creier: 32; drojdie: 128; cartofi: 10 *(Schröder, Woodward, 1937—1939)*. Avînd mai multe grupări disociabile prezintă mai multe trepte în valorile pK și anume:

$pK_1(COO^-) = 2{,}12$; $pK_2(COO^-) = 3{,}53$; $pK_3(NH_3^+) = 8{,}66$; $pK_4(SH) = 9{,}62$; $pH_i = 2{,}83$.

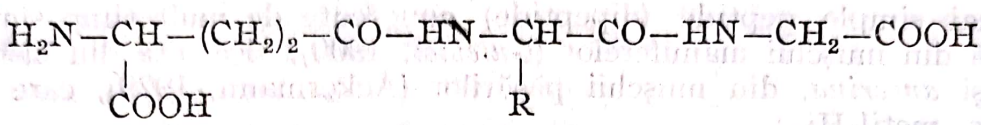
Importanța biologică a glutationului constă în participarea sa în reacțiile de oxidoreducere, prin sistemul: $2-SH \rightleftharpoons -S-S-$

$$2\ G-SH \underset{+2H}{\overset{-2H}{\rightleftharpoons}} G-S-S-G$$

(redus) (oxidat)

Sub efectul unei diete cu adaus de coloranţi azoici cancerigeni, glutationul redus creşte în ficatul şi splina şobolanilor (*V. Galea* şi colab.) ceea ce sugerează tulburări de oxidoreducere.

Din cristalinul ochiului s-au izolat derivaţi ai glutationului, ca de exemplu, *acidul oftalmic* (R=$-C_2H_5$) şi *noroftalmic* (R=$-CH_3$):



1.3.2.2.3. *PEPTIDE DE ORIGINE ANIMALĂ ŞI BACTERIANĂ. PEPTIDE BIOLOGIC ACTIVE. ANTIBIOTICE*

Din punct de vedere structural prezintă grade diferite de condensare, iar după rolul biologic se pot grupa în mai multe categorii:

Hormoni propriu-zişi, produşi de glandele cu secreţie internă, de exemplu, hipotalamus, hipofiză, pancreas endocrin.

Hormoni tisulari, produşi prin acţiunea unor proteaze asupra unui precursor din plasma sanguină sau dintr-un ţesut (organ) ca de exemplu, angiotensina, kininele şi substanţele similare acestora de la animalele inferioare (exemplu, eledoisina).

Hormonii „digestivi", produşi în special de celulele tractului digestiv, cu acţiuni diferite: asupra secreţiei apei şi electroliţilor („secretina" lui *Jorpe şi Mutt*, 1960); a apei, HCl şi enzimelor (gastrinele), asupra motricităţii fibrelor musculare *(colecistokinina, enterogastrona)*.

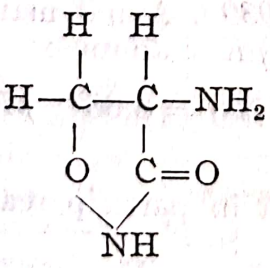
Polipeptide implicate în procesul inflamator sau toxice

Polipeptide care participă în coagulare şi fibrinoliză.

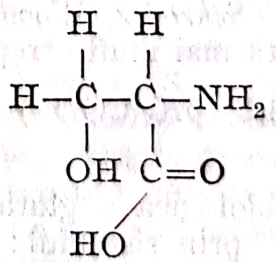
Polipeptide bacteriene, de interes special, *antibioticele.*

Polipeptidele naturale, care au beneficiat în mod deosebit de metodologia studiului peptidelor (stabilire de secvenţe; sinteze) au fost cele elaborate de microorganisme, dintre care unele manifestă acţiuni de antibiotice, prezentînd un larg interes în chimioterapia modernă. Numărul antibioticelor naturale, la care se adaugă şi cele de sinteză sau semisinteză este foarte mare, dar, cu toată diversitatea lor, ele posedă cîteva caractere fundamentale comune:

a. Sînt peptide de origine bacteriană, cu gr. mol. mică. În acest sens şi *oxamicina* (D-cicloserina), alcătuită dintr-un singur aminoacid (serina), poate fi încadrată în această grupă:



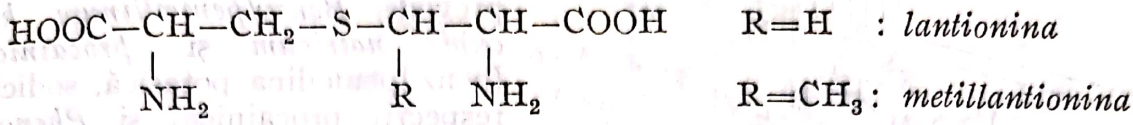
Cicloserina



D-Serina

După natura componenţilor şi tipul de legătură pot fi *homeomerice* sau *heteromerice* (de exemplu, polimixine, actinomicine).

b. Prezența unor aminoacizi neproteici, ca de exemplu, cei din seria D, ornitina, β-lizina (în viomicină), acidul α, γ-diaminobutiric (DAB sau Dia), lantionina sau metillantionina (în subtilină, nisină):



c. În *privința mecanismului de acțiune* se poate considera:

1. Acțiunea la nivelul *peretelui celular al bacteriilor* (alcătuit din heteropolimeri complecși ce conțin polizaharide, peptide și lipide speciale). Antibioticele din această grupă au în structura lor cisteina, angajată într-o legătură cu aminoacidul învecinat, formînd astfel un nucleu tiazolic (de exemplu, bacitracină, cefalosporine, peniciline). În general, ele interferează cu nucleotidele, precursori ai peretelui celular.

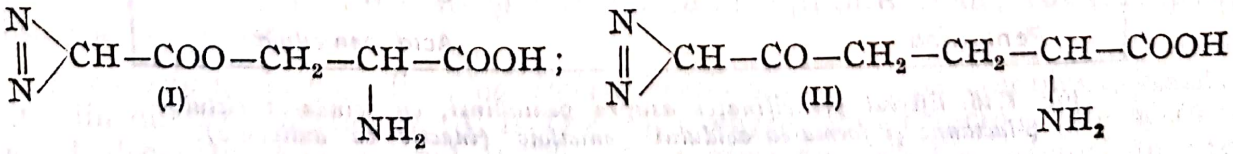
2. Acțiune asupra *membranei celulei bacteriene*, de natură lipoproteică, cu diferențe de compoziție și structurare între bacteriile Gram — și cele Gram + (nucleoproteidele sînt responsabile pentru afinitatea față de coloranții bazici și un complex „proteină-ribonucleat de Mg", pentru coloratia Gram). Caracterul lor comun rezultă din faptul că cele mai multe din ele au o structură polipeptidică ciclică și prezintă grupări hidrofile și lipofile; fiind încărcate pozitiv la pH neutru, pot fi considerate ca „detergenți cationici", care se fixează la nivelul grupărilor anionice (polifosfatice) ale membranei și produc dezorganizarea barierei osmotice, bacteriile devenind astfel incapabile să-și mențină compoziția normală *(B. Flouvat, 1969)*. Tirocidinele au acțiune bactericidă și bacteriostatică numai asupra bacteriilor Gram +, în timp ce polimixinele afectează și bacteriile Gram—

3. Acțiunea la nivelul *citoplasmei* apare la actinomicine, caracterizate prin prezența unei grupări prostetice (frecvent cromoforă), un conținut mare în acizi aminați N-metilați și cu o punte lactonă care ciclizează lanțul polipeptidic între capătul C terminal și OH din Ser sau Tre. Efectul citostatic și antimitotic se explică prin combinații competitive pe care le dau cu ADN, inhibîndu-se astfel diviziunea celulară și sinteza ARN și a proteinelor.

1.3.2.2.4. *REPREZENTANȚI MAI IMPORTANȚI AI POLIPEPTIDELOR ANTIBIOTICE*

Cicloserina (cycloserinum, oxamicina) este D-4-amino-3-isoxazolidona, antibiotic produs de *Streptomyces orchidaceus, graphalus, lavendulae* și prin sinteză. În doze terapeutice (0,5—1 g/24 h per os) are o eficiență destul de slabă în comparație cu a altor antibiotice, și utilizarea sa se restrînge la tuberculoza pulmonară și extrapulmonară, în special în formele cronice și rezistente la alte antibiotice și la HIN (hidrazida acidului izonicotinic). Alte domenii de aplicare sînt lepra și infecțiile urinare rezistente la antibiotice.

Azaserina (I) și *6-diazo-5-oxo-1-norleucina sau DON* (II), cu grupări diazoalifatice, obținute din *Str. species* sînt anticanceroase:



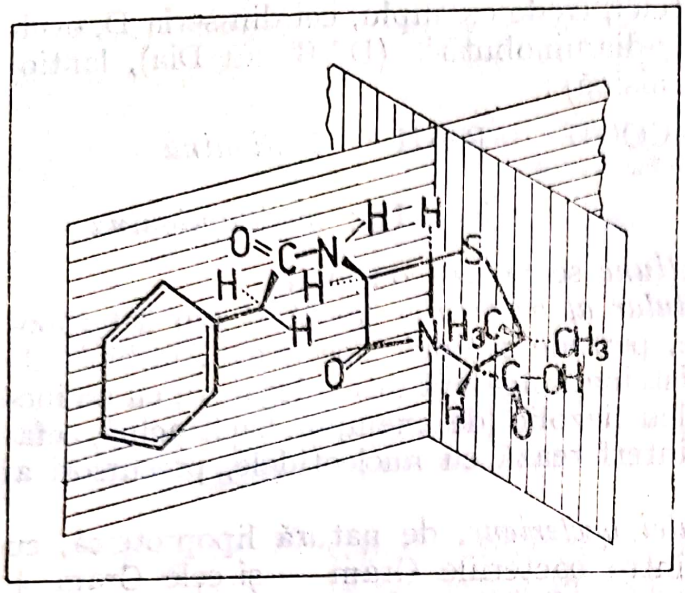


Fig. 1.45. Structura spațială a penicilinei G

Penicilinele reprezintă una din grupele cele mai importante de antibiotice *(figura 1.45)*; F.R.IX prevede *Benzylpenicillinum kalicum, natricum* și *procainicum* (benzilpenicilina potasică, sodică și respectiv procainică) și *Phenoxymethyl penicillinum* (fenoximetilpenicilina, penicilina V), produse de semisinteză, dar în terapia modernă se utilizează și alte peniciline, produse și la noi în țară de către *Fabrica de antibiotice din Iași*

Enzimele *penicilinaze* (de exemplu, din *Staphylococcus aureus*, formată din 257 aminoacizi, cu gr. mol. 28.800 sau din *Bacillus licheniformia*, cu 265 aminoacizi și gr.mol. 29.500) catalizează scindarea hidrolitică a structurii β-lactam cu formarea acidului *peniciloic (figura 1.46)* inactiv biologic. Formarea lor poate fi indusă în bacterii prin terapia cu penicilină (enzimă adaptativă); prin acest mecanism ele devin penicilinrezistente, de aceea s-au întreprins cercetări pentru obținerea prin semisinteză a unor peniciline rezistente la penicilinaze (active și pe bacteriile penicilinrezistente).

Grupa gramicidinei. Descoperirea polipeptidelor cu activitate antibiotică este legată de cercetările care urmăreau antagonismul bacteriilor cu *B. brevis (R. J. Dubos, C. Cataneo, 1939)*. Principiul activ, tirotricina, inițial descris, a fost ulterior separat în doi componenți activi: *gramicidina* și *tirocidina (R. D. Hotchkiss, R. J. Dubos, 1940)*. Gramicidinele constituie un amestec de mai multe componente: A, B, C, ciclopeptide heteromerice care conțin colamină, triptofan (a cărui conținut diferențiază grupele A, B, C), leucină, valină; gr. mol. este de 3.800—4.000.

Gramicidina S (sovietică) a fost izolată din *B. brevis (G. F. Gauze, M. G. Brazhnikova, 1934)*. Este alcătuită din mai multe peptide a căror component

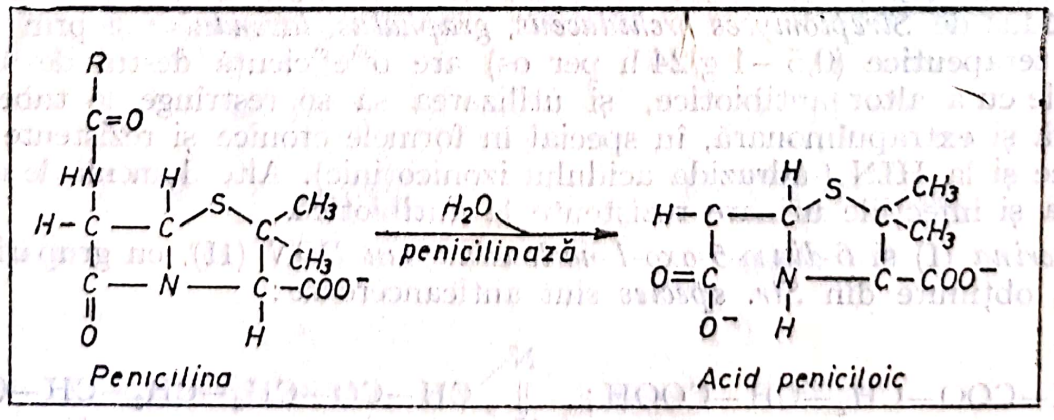


Fig. 1.46. Efectul penicilinazei asupra penicilinei, cu scindarea ciclului β-lactamic și formarea acidului peniciloic (inactiv ca antibiotic).

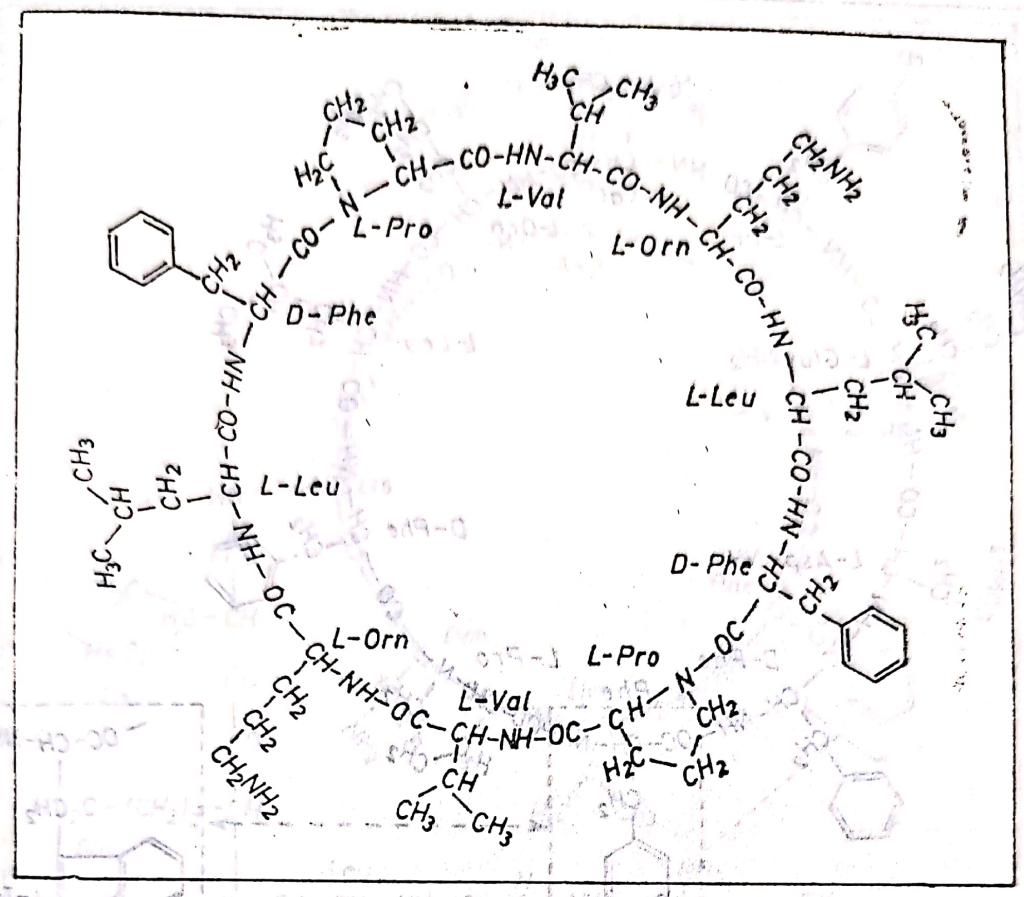


Fig. 1.47. Formula gramicidinei S (se observă simetria moleculei)

principal este *gramicidina S—A*, o ciclodecapeptidă cu gr. mol. 1.000 și în care 5 aminoacizi se repetă de 2 ori și anume: (-Val-Orn-Leu-Phe-Pro-)$_2$, cu formula structurală din *figura 1.47 (R. Constanden, A. H. Gordon, A. J. Martin, R. Synge, 1947)*.

Pentapeptidele sintetice, similare, sînt lipsite de activitate antibiotică, în schimb decapeptidele liniare sînt active dacă au gruparea δ-NH_2 a ornitinei libere. Unii copolimeri cu structură similară gramicidinei S sînt activi *(E. Katchalscki, 1955)*.

Tirocidinele A și *B* sînt tot ciclodecapeptide, care diferă între ele numai printr-un aminoacid și au jumătate din moleculă identică cu a gramicidinei S *(figura 1.48)*.

Complexul tirotricinei este deosebit de activ asupra pneumococilor Gram + a streptococilor, stafilococilor și mai puțin asupra germenilor Gram —. Gramicidina S, din contră, are un spectru larg care cuprinde și *Proteus vulgaris* și *Escherichia coli*. Din cauza toxicității mari nu se administrează parenteral, dar poate fi aplicată local, pe plăgi infectate și eventual în infecții intestinale, deoarece nu se absoarbe pe această cale.

Bacitracinele, izolate din *Bac. licheniformis* sînt o grupă complexă, constituită din diferite bacitracine (A, B, G etc.). Componentul principal este *bacitracina A*, decapeptidă cu gr. mol. 2.470 în care gruparea —SH a cisteinei nu este

Scanned with OKEN Scanner

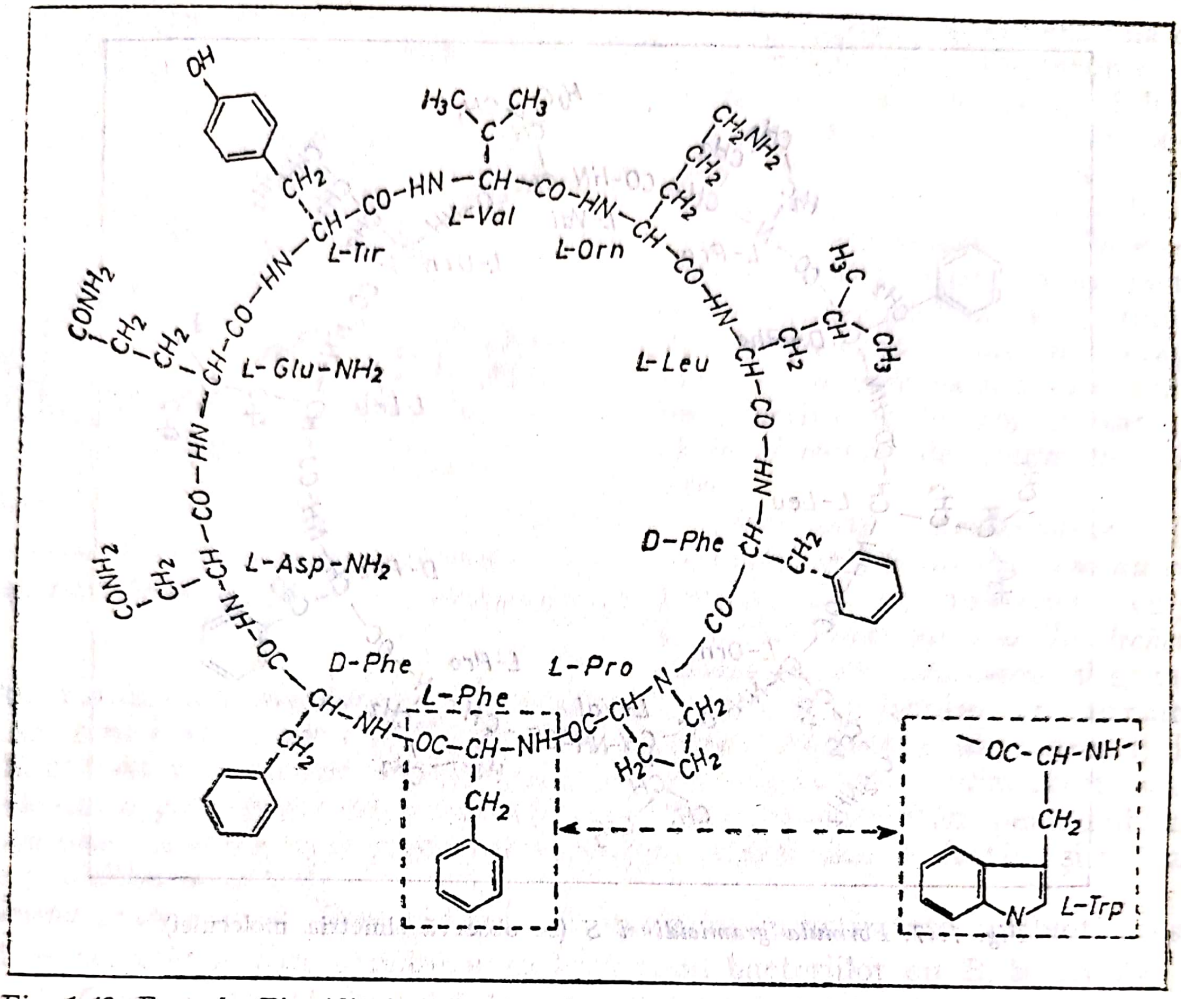


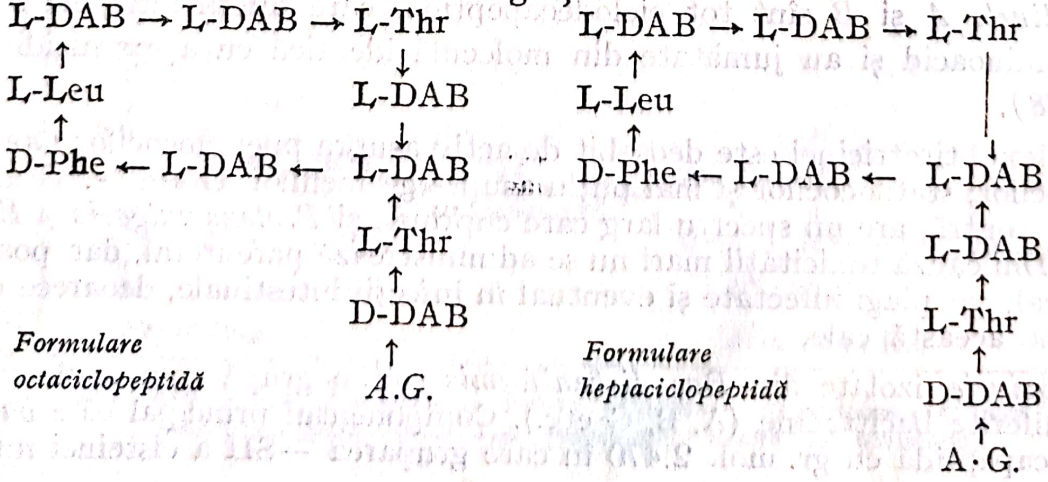
Fig. 1.48. Formula Tirocidinei A (în tirocidina B, L-Phe notată este înlocuită cu L-Trp).

liberă (nu dă reacţia cu nitroprusiat) formînd un ciclu tiazolic cu izoleucina *(fig. 1.49)*.

Este eficientă asupra inhibării microorganismelor Gram +: pneumococ, streptococ-β-hemolitic, micrococul piogen şi unele clostridii, dar este puţin utilizată în clinică din cauza toxicităţii renale.

Licheniforinele A, B, C, cu gr. mol. de aproximativ 4.100, au fost izolate din *B. licheniformis*.

Polimixinele, izolate din *B. polymyxa*, cu acţiune asupra bacililor Gram−, sînt peptide heteromerice, cu acizi graşi:



Formulare octaciclopeptidă

Formulare heptaciclopeptidă

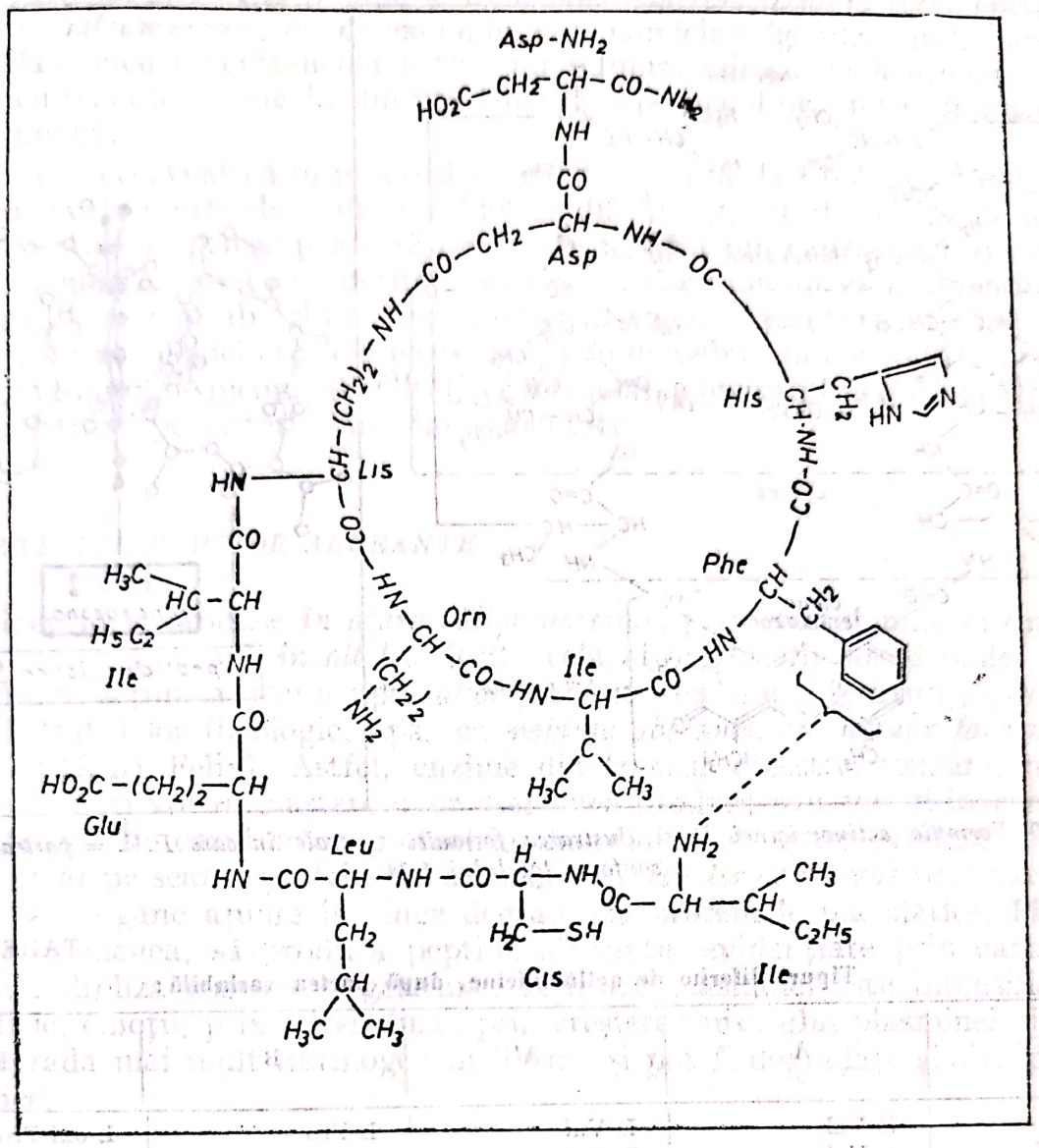


Fig. 1.49. Formula bacitracinei A

În structura polimixinei B_1 (de mai sus) apare ca *acid gras* (A.G.) *acidu metil-6-octanoic*, care se găsește în toate polimixinele, cu excepția polimixinei B_2 care conține un A.G. cu 8 atomi de C și a polipeptinei, care are acidul hidroxilheptanoic. A.G. formează o legătură amidă cu gruparea α sau γ a acidului α, γ-diaminobutiric (DAB) care nu este în ciclu (extraciclu).

Capsulele de *Polimixină B sulfat*, cu 0,03846 g produs activ se utilizează în special contra germenilor Gram—. Fiind neuro- și hepatotoxică, dar neabsorbită prin mucoase și piele, se indică în infecțiile tractului intestinal, ochiului, pielii, cavităților pleurale și meningeale.

Grupa *Actinomicinelor* cuprinde peptide heteromerice izolate din culturile de *Actomyces antibioticus*. Se cunosc mai bine tipurile C, I și X, de exemplu *actinomicina* C_3 *(figura 1.50)*. După natura părții variabile se disting diferitele tipuri de actinomicine *(tabelul 1.24)*.

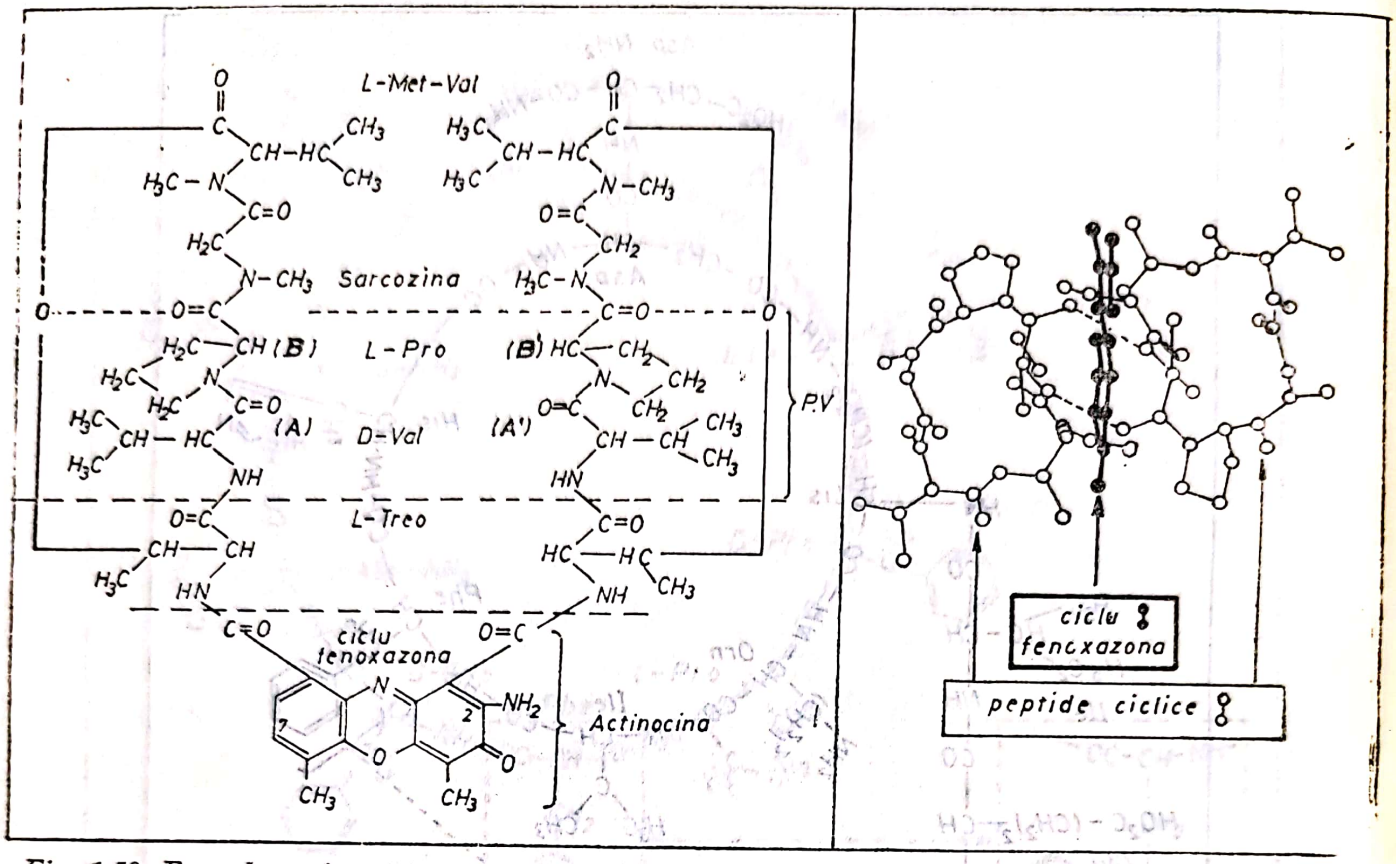


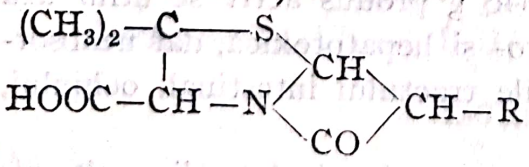
Fig. 1.50. Formula actinomicinei D și ilustrarea formulei generale în care P.V. = partea variabilă, conform tabelului 1.24.

TABELUL 1.24

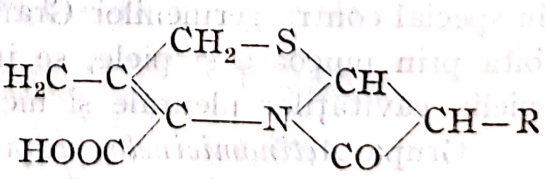
Tipuri diferite de actinomicine, după partea variabilă:

TIP	A	A′	B	B′
I	D-Val	D-Val	L-Pro	L-oxi-Pro
II	D-Val	D-Val	L-Pro	Sarcozină
III	D-Val	D-Val	Sarcozină	Sarcozină
IV	D-Val	D-Val	L-Pro	L-Pro
V	D-Val	D-Val	L-Pro	L-oxo-Pro
C_2	D-Val	D-al-Leu	L-Pro	L-Pro
C_3	D-al-Leu	D-al-Leu	L-Pro	L-Pro

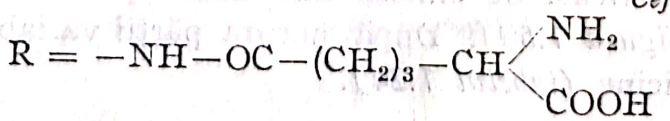
Din ciuperca *Cephalosporium acremonium* s-au izolat *cefalosporinele*, cu o structură similară penicilinelor, având la bază acidul 7-aminocefalosporanic, cu utilizări în infecțiile renale:



Cefalosporina N



Cefalosporina C



ACTINOMICETELE produc şi *antibiotice macromoleculare* (polipeptide sau proteine) *anticanceroase*, ca de exemplu, carcinomicina (gannmicina), carcinocidina, melanomicina, peptimicina, actinogan, refuina, ieşina, aiomicina, neocarcinostatina, cu rezultate bune în diferite tumori experimentale, unele aplicate şi în clinica umană.

Este de accentuat că în practică se utilizează la acelaşi bolnav, concomitent, sau la intervale scurte de timp, antibiotice diferite şi/sau alte grupe de medicamente. Efectul terapeutic poate să nu fie cel scontat din cauza unor *interacţiuni* între componente, la nivele diferite: *in vitro* (de exemplu, în soluţiile perfuzabile) şi *in vivo*, la nivelul absorbţiei, distribuţiei în sînge şi ţesuturi, în eliminare, la receptorii farmacologici etc. De aceea este de o deosebită importanţă cunoaşterea acestor interacţiuni (incompatibilităţi) şi formularea prescripţiilor şi a programului de administrare pe criterii bine fundamentate.

1.3.2.2.5. *POLIPEPTIDE ABERANTE*

Polipeptidele produse *în afara căilor normale*, prin efectul unor enzime proteolitice care acţionează *în alt loc* decît acela al producerii lor şi unde trebuie să-şi exercite acţiunea, sau asupra *altor proteine* (din sînge, ţesuturi), care reprezintă substratul lor fiziologic, apar ca *peptide aberante, cu acţiuni farmacologice* sau *toxice* (Kurt Felix). Astfel, enzime din tractul digestiv, tisulare, umorale sau din veninuri vor da naştere unor asemenea produse sau vor fi inactivate de alte proteaze. În cazul unor proteolize anormale pot apare produse toxice în duoden, chiar pe seama proteinelor alimentare *(Häbler)*; alteori proteazele unor ţesuturi sau organe ajunse în sînge degradează proteinele plasmatice. Plasmina poate de asemenea, să producă peptide aberante, evidenţiate prin capacitatea lor de a hidroliza caseina şi gelatina; acţiunea plasminei este intensificată în efortul fizic, emoţii, prin adrenalină; prin creşterea nivelului plasminei din sînge se va degrada mai mult fibrinogen în fibrină şi pot fi degradate şi alte proteine plasmatice.

1.3.3. OBŢINEREA ŞI CARACTERIZAREA PEPTIDELOR ŞI PROTEINELOR. METODOLOGIA DE STUDIU

1.3.3.1. OBŢINEREA ŞI PURIFICAREA PROTEINELOR

Proteinele din sursele naturale — ţesuturi şi umori animale; vegetale; microorganisme — se găsesc sub forme foarte complexe. Obţinerea lor, dificilă şi delicată, impune respectarea unor principii de conservare a integrităţii lor, prin eliminarea cauzelor de denaturare (variaţii mari de pH, temperaturi ridicate, spumare, agenţi precipitanţi denaturanţi), evitarea acţiunii enzimelor proteolice, adesea prezente în mediile biologice; protejarea faţă de contaminarea cu microorganisme etc.

Metodele uzuale ale chimiei organice (exemplu, distilarea şi extracţiile cu diferiţi solvenţi) nu pot fi în general aplicate proteinelor din cauza mărimii

Scanned with OKEN Scanner

și instabilității moleculelor acestora, impunîndu-se astfel o metodologie „proprie" a proteinelor.

Uneori proteina studiată se găsește în cantități foarte mici în materialul inițial (sub 0,1% din greutatea uscată), alături de cantități mari de alte proteine, cu proprietăți similare și alături de alți componenți biologici.

Punctul de plecare este alegerea materialului cu un conținut optim în proteina urmărită și care să se preteze izolării. Cînd proteina posedă proprietăți biologice caracteristice (de exemplu, activitate enzimatică, hormonală, imunologică etc.), alegerea este ușurată prin determinarea, prealabilă și în diferitele etape ale izolării, a acestor activități. Proteinele se găsesc adesea înglobate în arhitectura țesuturilor animale, vegetale sau în celulele bacteriene obligînd la eliberarea lor prin distrugerea structurilor celulare, cu ajutorul omogenizării, ultrasunetelor sau a altor metode; cînd proteinele sînt legate de particulele subcelulare, de exemplu, de mitocondrii, este necesară tratarea cu solvenți ai lipidelor sau detergenți.

O metodă larg aplicată în practică este tratarea țesutului fin omogenizat (broiat), de mai multe ori, cu 4—5 volume acetonă (sub 0°C); după eliminarea acetonei prin filtrare la vid, se extrage materialul cu eter (la rece), care, de asemenea se elimină prin filtrare la vid. Se obține astfel „*pudra acetonică*", eliberată de lipidele direct extractibile, conservabilă la rece.

Extragerea se face, de obicei, prin soluții apoase cu conținut mic de săruri neutre sau soluții tamponate, ușor acide sau bazice. Se indică utilizarea unor soluții concentrate (inițiale, sau pe parcurs, a diferitelor extracte) care favorizează randamentul; diluarea poate denatura proteinele. Concentrarea se poate face prin distilare la vid sub 40°C, dar este preferată dializa față de soluții hipertonice de polivinilpirolidonă, dextran 20% sau liofilizarea. Pentru obținerea anumitor proteine se aplică în continuare metode adecvate: precipitarea cu săruri, cu solvenți organici, precipitarea la pH_i, cromatografia, electroforeza, ultracentrifugarea etc.

Criterii de puritate. Una din problemele dificile ale purificării este stabilirea momentului cînd proteina este suficient de pură (omogenă). Spre deosebire de alte substanțe organice, care au criterii de puritate bine definite (p.t., cristalizarea), în cazul proteinelor situația este mai complicată. În timp ce cristalizarea și recristalizarea moleculelor mai mici permite obținerea unor substanțe pure, proteinele cristalizate sînt adesea neomogene, conținînd mai multe feluri de proteine.

Un criteriu al purității este raportul dintre cantitatea totală de proteină dizolvată într-un solvent potrivit și cantitatea totală de proteină; proteinele pure prezintă o dreaptă ascendentă pînă la momentul saturării, după care rămîne paralelă cu abscisa; la proteinele impure panta este mereu ascendentă *(figura 1.51)*.

Alte criterii utile sînt comportarea în ultracentrifugare, electroforeză, cromatografie, stabilirea pH_i, a greutății moleculare; datele analitice obținute pentru aminoacizii componenți, de exemplu, dacă hidroxilizina se găsește în cantitate de

Scanned with OKEN Scanner

0,2 moli/mol proteină se poate considera că gr. mol a proteinei este de 5 ori mai mare.

Pentru peptidele sau proteinele care prezintă activităţi biologice (de exemplu enzimatică sau hormonală), raportarea la greutatea uscată, la gr.mol. sau la conţinutul de N, poate servi pentru aprecierea purităţii. Unul din criteriile cele mai sigure, în cazul în care proteinele au proprietăţi imunologice, este reacţia de precipitare antigen-anticorp (de exemplu, în mediu gelificat) sau imunoelectroforeza *(P. Grabar, C. A. Williams Jr., 1953)*.

În principiu, pentru obţinerea şi aprecierea purităţii unei proteine se aplică metode şi tehnici diferite. Actul de decizie comportă obţinerea unor rezultate identice prin metode diferite.

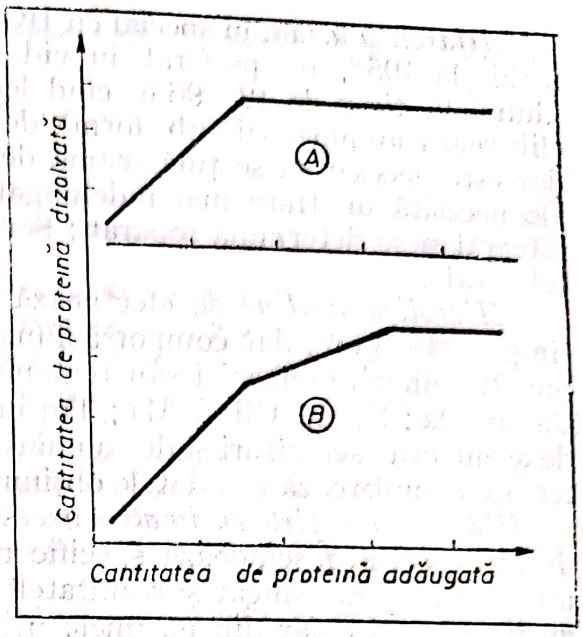


Fig. 1.51. Curbele de dizolvare a unei proteine pure (A) şi a unui amestec de două proteine (B) (după S. M. Rapoport, 1969)

1.3.3.2. COMPOZIŢIA ÎN AMINOACIZI ŞI DOZAREA PROTEINELOR

Aminoacizii din compoziţia proteinelor conţin: C (51—56%), H (6,5—7,7%), O (20—23%), N (15,5—18,5 %), unii şi S (2,0%); de asemenea, unele proteine conţin şi P (pînă la 1,0%) şi metale: Fe, Cu, Mg etc.

În aproape toate proteinele, *conţinutul de N este de 16%*, valoare de un deosebit interes practic, deoarece, prin simpla dozare a N, se poate calcula concentraţia proteinei, prin regula de „trei simplă"

16 g N . . . . . 100 g proteină de unde $X = \frac{a \cdot 100}{16}$ iar $\frac{100}{16} = 6{,}25$

a g N . . . . . X g proteină

Înmulţind N găsit cu 6,25 obţinem cantitatea de proteină la %.

Pentru dozarea *N total* se utilizează frecvent metoda *Parnas-Wagner* care comportă o „mineralizare" a proteinei (amestec de acid sulfuric/acid fosforic şi un catalizator: sulfat de cupru; sulfat mercuric sau selenitul de Hg, propus de *I. Manta* şi colab.). Operaţia, efectuată la fierbere, transformă N organic (proteic) în săruri minerale de amoniu, din care în mediu alcalin se eliberează amoniacul care este antrenat cu vapori de apă şi se dozează cu metode adecvate: culegerea în acid titrat şi determinarea excesului de acid cu NaOH; colorimetric (de exemplu, cu *reactivul Nessler:* iodură de Hg şi de K în soluţie apoasă alcalinizată); în prezent se utilizează metoda Parnas automatizată.

Hidroliza proteinelor. Determinarea aminoacizilor. Determinarea exactă a compoziţiei în aminoacizi este de mare importanţă pentru caracterizarea şi elucidarea structurii proteinelor şi comportă două etape principale: hidroliza proteinei şi dozarea aminoacizilor.

Pentru *hidroliză* se pot utiliza metode diferite.

Scanned with OKEN Scanner

Hidroliza acidă, în special cu HCl 6 N la fierbere cu reflux la 125° sau în tub închis la 105°, de preferat în vid sau N_2, pentru evitarea formării azotului „humic", timp de 12—96 h, cînd legăturile peptidice se rup în totalitate şi se eliberează aminoacizii sub formă de clorhidraţi. Rezultatele sînt satisfăcătoare, dar este necesar să se ţină seama de unele particularităţi: eliberarea Val, Leu, Ile necesită un timp mai îndelungat decît ceilalţi aminoacizi; Trp se distruge integral şi se determină separat; Ser şi Tre se găsesc în cantităţi mai mici decît cele reale.

Hidroliza alcalină se efectuează prin fierberea cu NaOH 2 — 4N, la 100°C, timp de 4—8 ore, dar comportă numeroase inconveniente, ca de exemplu, descompunerea unor aminoacizi sau remanieri structurale: Arg se transformă în Orn; Cis în Ala; Ser în Gli şi Ala; Tre în Gli şi acid α-aminobutiric etc.; se produc de asemenea racemizări şi dezaminări; deoarece triptofanul nu se distruge, valoarea sa completează util datele obţinute prin hidroliza acidă.

Hidroliza completă enzimatică necesită acţiunea secvenţială a mai multor enzime, deoarece acestea scindează specific numai unele tipuri de legături. Ea durează un timp mai îndelungat şi rezultatele pot fi falsificate prin contaminarea cu produşii eliberaţi chiar din enzimele utilizate. Deoarece aceste limitări sînt proprii hidrolizei totale şi pot fi evitate în *hidroliza parţială*, metodele enzimatice se dovedesc deosebit de utile pentru scindarea moleculelor mari şi în determinarea secvenţei aminoacizilor (vezi 1.3.4.1.2.).

Determinarea aminoacizilor. Hidroliza totală a peptidelor şi proteinelor dă naştere la un amestec, adesea foarte complex, de aminoacizi, în care obişnuit se găsesc cei 20—22 de aminoacizi componenţi ai proteinei, în proporţii diferite. Este posibil de exemplu, ca o proteină cu gr. mol. de 20.000 să conţină o singură moleculă a unui aminoacid (sub 0,4%); determinarea unei cantităţi aşa de mici într-un amestec de aminoacizi este desigur dificilă.

Analiza (determinarea) aminoacizilor dintr-un amestec (hidrolizat proteic) a parcurs trei etape. Prima a fost a dozării „specifice", în care s-a căutat elaborarea unor reacţii caracteristice pentru fiecare aminoacid şi dozarea lor individuală. Limita acestui tip de metode constă în faptul că rezultatele obţinute pe soluţii pure de aminoacizi sînt diferite de cele obţinute în amestec, datorită numeroaselor interacţiuni care se stabilesc între aminoacizii prezenţi şi care nu pot fi exact stabilite. În a doua etapă s-a căutat evitarea acestor interacţiuni prin fracţionarea prealabilă a amestecului de aminoacizi şi aplicarea reacţiilor specifice pe grupe bine definite, de exemplu, a aminoacizilor bazici, dicarboxilici, aromatici etc., ceea ce a crescut exactitatea determinărilor. A treia etapă comportă o fracţionare completă, deci o izolare a aminoacizilor şi dozarea lor. Această metodă, în diferite variante (cromatografie, determinări izotopice, microbiologice etc.) dă rezultate optime.

Reacţiile de culoare (tabelul 1.22), datorite legăturii peptidice sau unor aminoacizi, pot fi aplicate şi în cazul peptidelor şi proteinelor şi pe hidrolizatele acestora.

În selectarea metodelor de determinare a proteinelor pe baza dozării unui singur aminoacid, trebuie să se aibă în vedere că proporţia aminoacizilor variază de la o proteină la alta şi deci că intensitatea culorii este de asemenea diferită. Astfel, de exemplu, salmina (protamină) conţine 85% Arg, în timp ce β-lactoglobulina conţine numai 3%; intensitatea reacţiei *Sakaguki* (pentru arginină) este mult mai intensă pentru prima proteină. Cu toate aceste limitări, asemenea metode dau rezultate satisfăcătoare în cazul proteinelor diferite în amestec, deoarece în aceste condiţii diferiţii aminoacizi se pot compensa între ei. Aceleaşi observaţii sînt valabile şi pentru metoda xantoproteică, larg utilizată, prin care se dozează proteinele (de exemplu, din ser) pe baza culorii pe care o dau aminoacizii aromatici din componenţa proteinei cu acidul azotic.

Scanned with OKEN Scanner

Dintre metodele *specifice* se pot menționa:

— Dozarea *hidroxiaminoacizilor* (Ser, Tre) prin oxidarea cu acid periodic în soluție alcalină, după reacția:

$$R-CHOH-CH(NH_2)COOH + IO_4^- \rightarrow R-CHO + NH_3 + OHC-COOH + IO_3^-$$

Acetaldehida formată din Tre se antrenează în bisulfit; formaldehida provenită din ser este reținută în soluție de alți aminoacizi și se dozează prin metode adecvate (colorimetric sau prin precipitare cu dimedonă). Metoda permite dozarea „hidroxiaminoacizilor totali". Partea glucidică din glucoproteide poate fi sursă de erori.

— *Arg*, *His*, *Tir*, *Trp* pot fi determinați prin reacții de culoare.

— *Trp* și *Tir* pot fi dozați prin măsurarea densității optice la 279 și 288 nm (primul are o absorbție mai puternică); metoda se poate considera ca general valabilă pentru toate proteinele.

— *Met*, tratată cu iod în mediu neutru, formează periodura ionului sulfoniu: $R.S^+I_3 \cdot CH_3 \cdot I^-$, care eliberînd spontan iodul, în mediu acid, servește pentru dozarea sa în amestec cu alți aminoacizi.

Tehnicile de separare pe grupe se aplică în special amestecurilor foarte complexe, în scopul „simplificării" amestecului inițial. La baza acestor separări stă migrarea lor în cîmp electric (iontoforeza) sau cromatografia. Astfel, de exemplu, la pH 5—6 aminoacizii neutri se găsesc sub formă dipolară; bazele hexonice (aminoacizii bazici) sub formă de cationi, iar cei dicarboxilici sub formă anionică, ceea ce permite separarea lor în 3 grupe.

Metodele cromatografice se bazează pe reținerea caracteristică a unor substanțe dizolvate, în raport cu solventul, cînd soluția trece printr-o fază independentă. Reținerea se datorește, în general, interacțiunilor fizice sau electrostatice între substanța solvită și o fază solidă, sau solubilității substanței dizolvate, într-o a doua fază lichidă, nemiscibilă cu prima și imobilă. Se obișnuiește astfel clasificarea în trei tipuri: de adsorbție, de partiție și schimbătoare de ioni.

Cromatografia de adsorbție constă în trecerea amestecului de analizat printr-o coloană ce conține materialul care adsoarbe (reține) selectiv unii din componenții amestecului, care se situează în zone diferite. După spălarea coloanei cu soluții potrivite se izolează porțiunile din coloană care conțin substanța reținută sau se procedează la eluarea cu solvenți specifici care permit eliberarea (desorbția) diferențială a componenților reținuți. Coloanele cu cărbune activat separă grupa aminoacizilor aromatici sau peptidele care conțin asemenea aminoacizi; cromatografia pe silice separă fracțiunea aminoacizilor bazici dintr-un hidrolizat parțial acid *(C. Fromegeot, 1948)*; cromatografia pe oxiceluloză este utilizată pentru separarea polipeptidelor cu gr.mol. mai mare *(E.B. Astwood, 1951)*. Această metodă a fost elaborată de *Țvet (1903—1906)* care a aplicat-o pentru separarea clorofilelor din plantele verzi.

Cromatografia de partiție (A.J.P. Martin, R.L.M. Synge, 1941) se bazează pe proprietatea unei substanțe dizolvate de a se repartiza între două faze lichide nemiscibile între ele: o fază mobilă (solventul inițial) și o fază făcută staționară de către un suport solid. Migrarea substanței dizolvate depinde de deplasarea soluției, de volumul respectiv al fazelor și de coeficientul de repartiție al substanței între cele două lichide. Migrarea substanței solvite pe coloană este dată de relația: $R = \frac{A}{A_L + \alpha A_S}$, în care R = raportul între distanța parcursă de substanța solvită și distanța suprafeței libere a soluției; A, A_L și A_S = suprafețele secțiunilor transversale ale coloanei, fazei mobile și respectiv staționare; α = coeficientul de partiție, definit ca raportul C_S/S_L a concentrației substanței solvite între cele două faze (la echilibru). Valorile R determinate experimental nu sînt identice cu cele obținute din formulă (teoretice). Acest inconvenient se exclude prin stabilirea R experimental pentru substanțele studiate, în condițiile de lucru aplicate. Acestui tip îi aparține și cromatografia pe hîrtie, una din cele mai valoroase metode de separare, nu numai a aminoacizilor, ci și a numeroase alte grupe de substanțe *(a se vedea și 1.1.3. și figura 1.11)*.

Cromatografia pe hîrtie permite separarea componenților pe baza coeficientului de partiție între o fază organică și una apoasă. Amestecul de separat se aplică pe o hîrtie de filtru (suport) irigată cu un lichid compus dintr-o fază apoasă (staționară) și o componentă organică (faza mobilă). Aminoacizii care sînt mai solubili în faza organică și insolubili în cea apoasă migrează mai repede, deci se vor găsi mai aproape de frontul de migrare al lichidului; cei mai solubili în faza apoasă, din contră, se vor situa mai aproape de punctul de start, migrarea lor fiind mai lentă. În acest caz, termenul R din cromatografia pe coloană se înlocuiește cu R_f (factor de retenție), definit ca raportul dintre distanța parcursă de substanța dizolvată (de exemplu, aminoacid) față de distanța de mi-

Scanned with OKEN Scanner

grare a fazei mobile (frontul lichidului). Cînd se ia în considerare numai repartiția, R_f este dat de relația:

$$R_f = R \cdot \frac{A_L}{A} = \frac{A_L}{A_L + \alpha A_S}.$$ În mod simplu se poate defini R_f-ul sub forma:

$$R_f = \frac{\text{Distanța parcursă de centrul de greutate al spotului aminoacidului}}{\text{Distanța parcursă de frontul lichidului}}$$

Deoarece R_f-ul poate fi influențat de diferiți factori, de exemplu, de temperatură, de interacțiuni între aminoacizii din amestec etc. se utilizează în practică stabilirea valorii sale față de aminoacizi martori.

Cromatografia pe hîrtie se poate realiza în diferite variante tehnice: descendentă sau ascendentă; unidimensională; bidimensională; circulară etc.

În cazul cromatografiei *unidimensionale* (monodimensionale) *ascendentă*, pe o coală de hîrtie de filtru se trasează cu creionul o linie la 3—4 cm de marginea inferioară și aici se depun picături din soluția de analizat (sau benzi); la distanțe potrivite (pentru a nu se suprapune) se depun soluții de aminoacizi puri sau în amestec, cunoscuți, care servesc de referință. După uscarea spoturilor se introduce hîrtia de filtru în camera cromatografică, unde vine în contact cu sistemul de solvenți (irigant) constituit din cele două faze lichide parțial miscibile: faza apoasă și solvenții neapoși (butanol, fenol, piridină etc.). Lichidele imbibă hîrtia prin capilaritate; apa rămîne pe fibrele de celuloză (hîrtia de filtru) și constituie faza staționară, iar solvenții organici, faza mobilă, antrenează compușii amestecului, pe care îi transportă cu viteze și respectiv la distanțe diferite, pe baza coeficientului lor de repartiție între cele două faze. Cînd solventul ajunge aproape de marginea superioară a hîrtiei, aceasta se scoate din aparat, se usucă la temperatura camerei (și dacă este necesar, la etuvă la 90°—100°C) și se pulverizează cu o soluție de ninhidrină 0,1% în butanol, observîndu-se și delimitîndu-se petele (spoturile) de culoare albastru-violetă, ce corespund diferiților aminoacizi. Identificarea acestora se face pe baza R_f-ului (raportul dintre distanța de la centrul spotului și punctul de start față de distanța frontului de migrare al lichidului de la start), care este caracteristic pentru fiecare aminoacid într-un anumit sistem de solvenți; se utilizează tabele corespunzătoare pentru R_f-uri și se corectează în raport cu valorile obținute pentru aminoacizii de referință.

Cromatografia bidimensională reprezintă o perfecționare a metodei precedente și constă în efectuarea unei duble cromatografii monodimensionale, pe direcții perpendiculare, folosind succesiv două sisteme de solvenți.

O variantă a acestei metode este cromatografia derivaților 2-4-dinitrofenolici ai aminoacizilor. Hidrolizatul de proteine (sau amestecul de aminoacizi) se tratează cu 2-4-dinitrobenzen la pH 8 și 40° timp de o oră, se efectuează o extragere cu eter și extractul se supune cromatografiei bidimensionale pe hîrtie.

Determinarea cantitativă a aminoacizilor se poate face prin decuparea spoturilor, care se eluează separat cu solvenți potriviți, și apoi se dozează fiecare aminoacid, în parte, prin măsurarea densității optice.

Cromatografia pe schimbători de ioni. Schimbătorii de ioni sau „ioniții" sînt alcătuiți dintr-un schelet macromolecular, *R*, insolubil pe care sînt grefate grupări active cu ioni mobili care pot fi schimbați cu ioni cu aceeași sarcină din soluție. Ei se comportă ca polielectroliți acizi, cînd pun în libertate H^+ sau bazici cînd eliberează OH^- și pot fi *cationiți:* HR, H—R, H^+R^- sau H-cationit avînd R^- un macroanion și *anioniți:* HOR, HO—R, R^+OH^- sau HO-anionit, în care R^+ este un macrocation. Ei reacționează în modul următor:

$$HR + NaCl \rightleftharpoons NaR + HCl \qquad \text{sau} \qquad 2HR + CaCl_2 \rightleftharpoons CaR_2 + 2H_2O$$

$$HOR + HCl \rightleftharpoons ClR + H_2O \qquad \text{sau} \qquad 2HOR + H_2SO_4 \rightleftharpoons SO_4R_2 + 2H_2O$$

În mod simplu, metoda separă aminoacizii în trei grupe: acizi, neutri, bazici. Inițial se trece amestecul (de exemplu, hidrolizat de proteine) la pH = 3 prin coloana de tip rezină de polistiren-sulfonat. În aceste condiții, aminoacizii individuali sînt încărcați + și deplasează ionii Na^+ din grupele $-SO_3Na^+$ ale coloanei, legîndu-se în locul acestora de cationit, prin forțe electrostatice; cei mai bazici se leagă mai puternic *(figura 1.52)*. Coloana se eluează cu soluții tampon cu pH și forță ionică crescătoare. În aceste condiții se neutralizează progresiv sarcinile + ale aminoacizilor și prin aceasta slăbește puterea legăturilor saline, cu detașarea, progresivă a aminoacizilor mai acizi (Glu, Asp), apoi neutri și final bazici. În mod similar, aminoacizii bazici sînt reținuți pe „alumina-bazică" sau pe silicagel, iar cei acizi pe „alumina-acidă" (alumină tratată în prealabil cu HCl sau tampon acetic la pH=3). Aminoacizii neutri nu sînt, în principiu, reținuți pe aceste forme de alu-

Scanned with OKEN Scanner

grare a fazei mobile (frontul lichidului). Cînd se ia în considerare numai repartiția, R_f este dat de relația:

$$R_f = R \cdot \frac{A_L}{A} = \frac{A_L}{A_L + \alpha A_S}.$$ În mod simplu se poate defini R_f-ul sub forma:

$$R_f = \frac{\text{Distanța parcursă de centrul de greutate al spotului aminoacidului}}{\text{Distanța parcursă de frontul lichidului}}$$

Deoarece R_f-ul poate fi influențat de diferiți factori, de exemplu, de temperatură, de interacțiuni între aminoacizii din amestec etc. se utilizează în practică stabilirea valorii sale față de aminoacizi martori.

Cromatografia pe hîrtie se poate realiza în diferite variante tehnice: descendentă sau ascendentă; unidimensională; bidimensională; circulară etc.

În cazul cromatografiei *unidimensionale* (monodimensionale) *ascendentă*, pe o coală de hîrtie de filtru se trasează cu creionul o linie la 3—4 cm de marginea inferioară și aici se depun picături din soluția de analizat (sau benzi); la distanțe potrivite (pentru a nu se suprapune) se depun soluții de aminoacizi puri sau în amestec, cunoscuți, care servesc de referință. După uscarea spoturilor se introduce hîrtia de filtru în camera cromatografică, unde vine în contact cu sistemul de solvenți (irigant) constituit din cele două faze lichide parțial miscibile: faza apoasă și solvenții neapoși (butanol, fenol, piridină etc.). Lichidele imbibă hîrtia prin capilaritate; apa rămîne pe fibrele de celuloză (hîrtia de filtru) și constituie faza staționară, iar solvenții organici, faza mobilă, antrenează compușii amestecului, pe care îi transportă cu viteze și respectiv la distanțe diferite, pe baza coeficientului lor de repartiție între cele două faze. Cînd solventul ajunge aproape de marginea superioară a hîrtiei, aceasta se scoate din aparat, se usucă la temperatura camerei (și dacă este necesar, la etuvă la 90°—100°C) și se pulverizează cu o soluție de ninhidrină 0,1% în butanol, observîndu-se și delimitîndu-se petele (spoturile) de culoare albastru-violetă, ce corespund diferiților aminoacizi. Identificarea acestora se face pe baza R_f-ului (raportul dintre distanța de la centrul spotului și punctul de start față de distanța frontului de migrare al lichidului de la start), care este caracteristic pentru fiecare aminoacid într-un anumit sistem de solvenți; se utilizează tabele corespunzătoare pentru R_f-uri și se corectează în raport cu valorile obținute pentru aminoacizii de referință.

Cromatografia bidimensională reprezintă o perfecționare a metodei precedente și constă în efectuarea unei duble cromatografii monodimensionale, pe direcții perpendiculare, folosind succesiv două sisteme de solvenți.

O variantă a acestei metode este cromatografia derivaților 2-4-dinitrofenolici ai aminoacizilor. Hidrolizatul de proteine (sau amestecul de aminoacizi) se tratează cu 2-4-dinitrobenzen la pH 8 și 40° timp de o oră, se efectuează o extragere cu eter și extractul se supune cromatografiei bidimensionale pe hîrtie.

Determinarea cantitativă a aminoacizilor se poate face prin decuparea spoturilor, care se eluează separat cu solvenți potriviți, și apoi se dozează fiecare aminoacid, în parte, prin măsurarea densității optice.

Cromatografia pe schimbători de ioni. Schimbătorii de ioni sau „ioniții" sînt alcătuiți dintr-un schelet macromolecular, *R*, insolubil pe care sînt grefate grupări active cu ioni mobili care pot fi schimbați cu ioni cu aceeași sarcină din soluție. Ei se comportă ca polielectroliți acizi, cînd pun în libertate H^+ sau bazici cînd eliberează OH^- și pot fi *cationiți:* HR, H—R, H^+R^- sau H-cationit avînd R^- un macroanion și *anioniți:* HOR, HO—R, R^+OH^- sau HO-anionit, în care R^+ este un macrocation. Ei reacționează în modul următor:

$$HR + NaCl \rightleftharpoons NaR + HCl \qquad \text{sau} \qquad 2HR + CaCl_2 \rightleftharpoons CaR_2 + 2H_2O$$

$$HOR + HCl \rightleftharpoons ClR + H_2O \qquad \text{sau} \qquad 2HOR + H_2SO_4 \rightleftharpoons SO_4R_2 + 2H_2O$$

În mod simplu, metoda separă aminoacizii în trei grupe: acizi, neutri, bazici. Inițial se trece amestecul (de exemplu, hidrolizat de proteine) la pH = 3 prin coloana de tip rezină de polistiren-sulfonat. În aceste condiții, aminoacizii individuali sînt încărcați + și deplasează ionii Na^+ din grupele $-SO_3Na^+$ ale coloanei, legîndu-se în locul acestora de cationit, prin forțe electrostatice; cei mai bazici se leagă mai puternic *(figura 1.52)*. Coloana se eluează cu soluții tampon cu pH și forță ionică crescătoare. În aceste condiții se neutralizează progresiv sarcinile + ale aminoacizilor și prin aceasta slăbește puterea legăturilor saline, cu detașarea, progresivă a aminoacizilor mai acizi (Glu, Asp), apoi neutri și final bazici. În mod similar, aminoacizii bazici sînt reținuți pe „alumina-bazică" sau pe silicagel, iar cei acizi pe „alumina-acidă" (alumină tratată în prealabil cu HCl sau tampon acetic la pH=3). Aminoacizii neutri nu sînt, în principiu, reținuți pe aceste forme de alu-

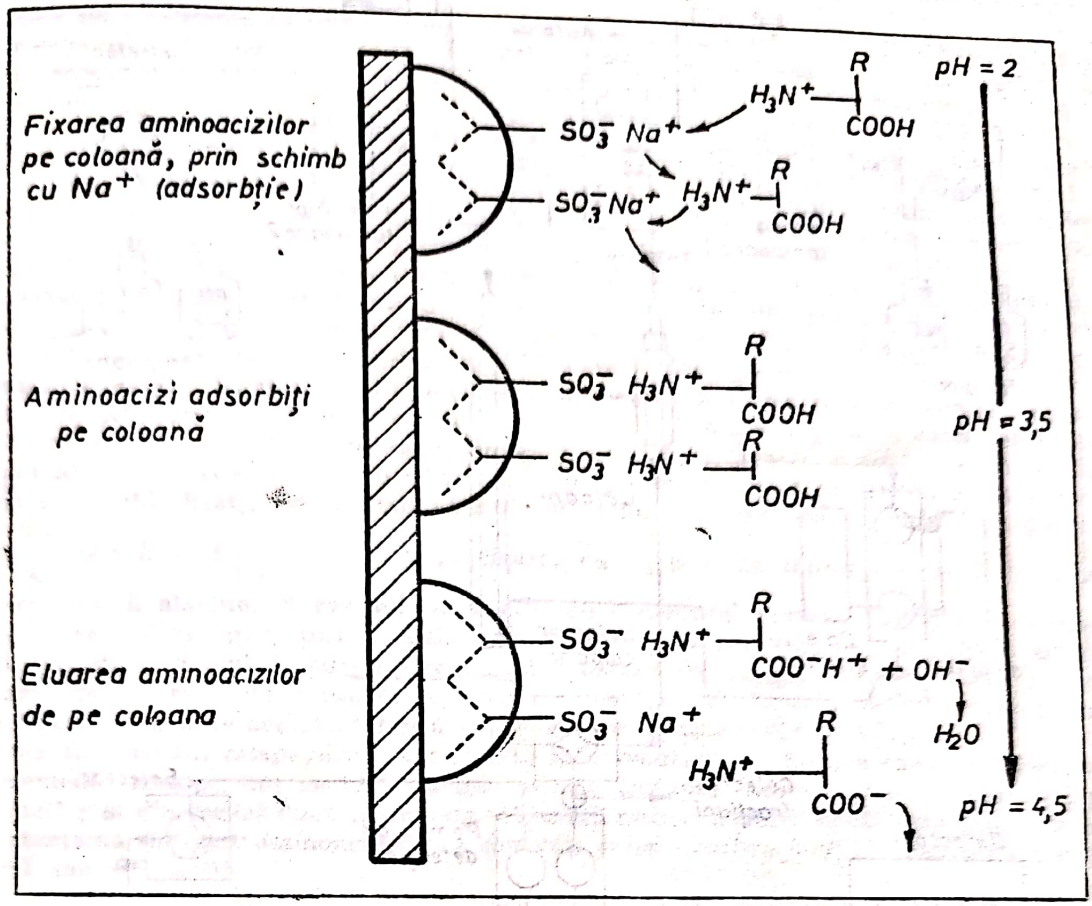


Fig. 1.52. Adsorbția și eluția aminoacizilor pe coloană cu schimbători de ioni (după S. M. Rapoport, 1969)

mină, dar în alcool 90°, care slăbește disocierea grupării aminice, ei sînt reținuți pe alumina acidă, în prezență de formaldehidă (Gli, Ser, Tre).

Sitele moleculare reprezintă o perfecționare a metodelor de separare, cu ajutorul unor derivați macromoleculari ai dextranului (Sephadex) sau a altor macromolecule, sub forma unor granule sferice, care, datorită numărului mare de grupări —OH se umflă în apă sau electroliți. Gradul de umflare este o caracteristică importantă, deoarece gelurile în care matricea este un component minor servesc separării moleculelor mari, iar gelurile compacte pentru moleculele mici. În principiu, moleculele cu dimensiuni superioare porilor macromoleculei (umflată) nu pătrund în canalele din gel, trec prin coloană în faza lichidă și se eluează primele; moleculele mai mici pătrund în particulele de gel, de unde se eluează, separîndu-se astfel pe baza dimensiunilor și formelor pe care le au.

În prezent, există produși care însumează proprietățile „sitelor moleculare" cu a „schimbătorilor de ioni". Astfel, de exemplu s-au grefat pe matricea de Sephadex radicali de dietilaminoetil [DEAE = $-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2H$] obținîndu-se un schimbător de anioni slab bazic; cu resturi de aminoetil-cuaternar [QAE = $-C_2H_4N^+(C_2H_5)_2CH_2CH(OH)CH_3$], schimbători de ioni puternic bazici; cu carboximetil [CM = $-CH_2COO^-$] schimbători de cationi slabi acizi; cu sulfopropil [SP = $-C_3H_6SO_3^-$] schimbători de cationi puternic acizi etc.

Avînd în vedere importanța deosebită a analizei amestecurilor de aminoacizi, atît în hidrolizatele proteice, pentru stabilirea compoziției și secvenței aminoacizilor, cît și în lichidele biologice (sînge, urină, LCR etc.) în scop de diagnostic clinic, s-au realizat aparate automatizate, *Autoanalizatoare*, care separă aminoacizii (de exemplu, pe coloane schimbătoare de ioni), colectează separat aminoacizii, efectuează reacția cu ninhidrina, determină intensitatea culorii și reprezintă grafic rezultatele sub forma unei diagrame, din care se calculează valoarea fiecărui aminoacid. Asemenea autoanalizatoare se utilizează și pentru separarea sau determinarea altor componenți; o schemă de funcționare a acestora este prezentată în figura *1.53*.

Cromatografia în stare gazoasă sau *gaz-cromatografia* este una din metodele cele mai precise aplicată compușilor care se găsesc, sau pot fi aduși în stare gazoasă și care sînt separați selectiv, cu ajutorul unui gaz „purtător", în coloane de dimensiuni mari și la temperaturi ridicate.

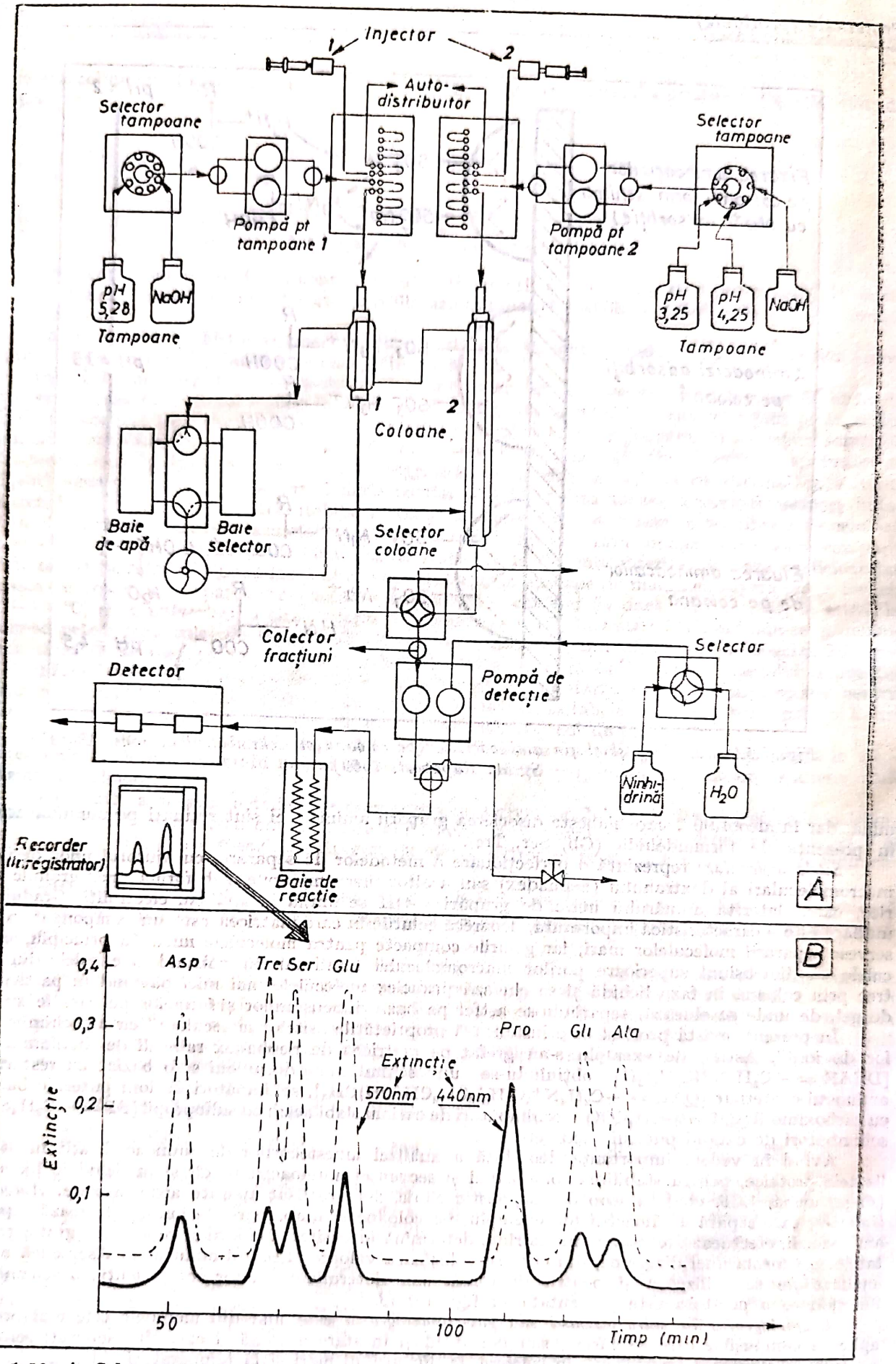


Fig. 1.53. A. Schema generală (simplificată) a unui autoanalizator pentru aminoacizi şi B. cromatograma tipică (parțială) obținută la 440 și 570 nm

Scanned with OKEN Scanner

Metodele microbiologice valorifică proprietatea unor aminoacizi de a fi indispensabili pentru unele microorganisme. Cunoscînd necesităţile în aminoacizi ale unei suşe de microorganisme se elaborează un mediu de cultură care conţine toţi factorii necesari, *cu excepţia aminoacidului de dozat;* se urmăresc modificările apărute (încetarea creşterii, întreruperea unor etape metabolice etc.) şi corectarea acestora prin adăugarea aminoacidului în cauza. Astfel, de exemplu, *Leuconostoc mesenteroides* necesită L-tirozina; în lipsa acesteia încetează creşterea coloniilor şi producerea acidului lactic; prin adăugarea *L-Tir* se produce normalizarea şi creşterea formării acidului lactic (care se dozează), pînă la atingerea unei valori optime, de unde se apreciază cantitatea de L-Tir prezentă. Sensibilitatea şi specificitatea metodei poate fi crescută prin utilizarea unor mutanţi, de exemplu, *Neurospora* supusă razelor X, care a permis urmărirea metabolismului triptofanului. Inconvenientul principal este posibilitatea unor erori destul de mari (de ±8%) datorite particularităţilor biologice ale microorganismelor utilizate pentru testare şi care pot fi evitate prin urmărirea unor reacţii enzimatice produse, de exemplu, de decarboxilazele specifice bacteriene.

Tehnici cu izotopi. În metoda *diluţiei izotopice*, pentru dozarea unui aminoacid, de exemplu, L-Ala dintr-un hidrolizat, se adaugă o cantitate A g de L-Ala-izotopică, a cărei concentraţie de izotop ^{15}N este notată cu C_0. Din amestec se izolează, prin recristalizări, o cantitate de L-Ala pură. Dacă se notează cu C, concentraţia în ^{15}N a acestui produs şi cu B cantitatea de Ala (aminoacidul de dozat din hidrolizat), considerînd că izotopul a fost „diluat" cu N normal, se poate scrie: $\frac{A+B}{A} = \frac{C_0}{C}$ sau $B = A\left(\frac{C_0}{C} - 1\right)$, cu precizarea că C_0 şi C nu reprezintă cantitatea totală de izotop în cele două alanine, ci excesul, în raport cu conţinutul normal. Cantitatea aminoacidului de dozat, B, se obţine uşor, prin calcul. Datorită dificultăţilor tehnice: separarea cantitativă a substanţei, recristalizări pînă la puritate (conţinut constant de izotop), dozarea exactă a izotopului, care necesită spectrografia de masă, şi faptului, că, în general, metoda nu dă rezultate mai bune decît alte tipuri de metode această tehnică şi-a găsit mai puţine aplicaţii practice.

Metoda *determinării compuşilor izotopici* este mai avantajoasă. Ea constă în marcarea aminoacizilor cu elemente izotope sau cu radicali care conţin izotopul. Amestecul se fracţionează printr-o metodă uzuală şi se efectuează dozarea pe baza măsurării radioactivităţii fiecărei fracţiuni. Ca exemplu se poate menţiona dozarea aminoacizilor ca derivaţi *p-iodo-fenil-sulfonilici* (derivaţi pipsilaţi) marcaţi cu ^{131}I sau ^{131}I şi ^{35}S.

1.3.3.3. PROTEINELE CA ELECTROLIŢI ŞI TAMPOANE

Multe proprietăţi importante ale peptidelor şi proteinelor se bazează pe caracterul lor de *electroliţi multivalenţi* datorit resturilor laterale ale aminoacizilor acizi (Asp, Glu), bazici (Liz, His, Arg), precum şi grupărilor —SH (cistenă) sau —OH (—OH fenolic din Tir) şi în mai mică măsură grupărilor α—NH_2 şi α—COOH, care sînt implicate în legăturile peptidice.

Dacă pentru soluţiile de aminoacizi individuali este uşor să se înregistreze şi să se interpreteze *curbele de titrare* caracteristice, în cazul proteinelor situaţia este mult mai complexă şi interpretarea teoretică dificilă, deoarece numărul grupărilor titrabile este mare: 50—60/gr. mol. de 100.000 şi valorile pK_α a grupărilor titrabile din proteine diferă cu una sau mai multe unităţi faţă de a aminoacidului singur, de exemplu, His liberă are $pK = 6{,}1$ şi în proteine 5,6—7,0. În plus, un anumit aminoacid dintr-o proteină poate avea pK_α de valori diferite, de exemplu, pentru o proteină care conţine 10 resturi de acid aspartic, valoarea pK_α a grupărilor —COOH (care nu sînt cuprinse în legăturile peptidice) se situează între 3—6. Aceste variaţii ale disocierii grupărilor din proteine depind de trei factori: efectele electrostatice, ca rezultat al ionizării altor grupări ale proteinei; efectele de mediu şi legăturile de hidrogen.

Interpretarea teoretică a efectelor electrostatice ale echilibrului ionilor H^+ din macromolecule se poate face considerînd o moleculă proteică perfect sferică şi uniform încărcată, cînd: $pH = pK_{int} + \log\frac{\alpha}{1-\alpha} - 0{,}868\,\omega\bar{Z}$, în care $pK_{int} =$

$= pK_\alpha$ intrinsec (în absența sarcinii) a unei anumite grupări; $\bar{\alpha}$ = fracțiunea grupelor acide ionizate; $\bar{Z}$ = valoarea medie a sarcinii moleculei; ω = factor complex ce depinde de constanta dielectrică și de alte variabile. Ecuația permite interpretarea curbelor de titrare, pentru o peptidă constituită din același tip de aminoacizi, de exemplu, o poli-L-tirozină, cu 30 resturi de L-tirozină *(E. Katchalski, M. Sela, 1953)*.

Efectele mediului se manifestă asupra disocierii grupelor, iar legăturile de H prin stabilizarea formelor acide sau bazice ale grupelor ionizabile, cu repercusiuni asupra formării și eliberării H^+. Interpretarea curbei de titrare a ribonucleazei, proteină mică și aproape sferică, arată o concordanță între numărul grupărilor titrabile în fiecare domeniu de *pH* și compoziția în aminoacizi, relevînd în special comportarea grupărilor fenolice ale tirozinei; din cele 6 grupări —OH ale Tir, 3 disociază normal, cu $pK_{int} = 9{,}95$, și celelalte 3 numai peste *pH* 12, pledînd pentru orientarea acestora spre interiorul moleculei native (mai greu accesibile mediului) și pentru faptul că prin titrarea acestor grupe se produc efecte ireversibile asupra legăturilor implicate în structura proteinelor (denaturări).

Datorită ansamblului de grupări disociabile, proteinele (ca și aminoacizii) au caracter *amfoter*, comportîndu-se ca baze în mediu mai acid decît pH_i și ca acizi în mediu mai bazic:

— în mediu *acid* ($< pH_i$): $\mathrm{PROT{-}CH\langle^{NH_3^+}_{COO^-} + H^+ \rightarrow PROT{-}CH\langle^{NH_3^+}_{COOH}}$

— în mediu *bazic* ($> pH_i$): $\mathrm{PROT{-}CH\langle^{NH_3^+}_{COO^-} + OH^- \rightarrow PROT{-}CH\langle^{NH_2}_{COO^-} + H_2O}$

NH_3^+ și $-COO^-$ simbolizează „suma" grupărilor bazice și respectiv acide; apar și alte particularități, legate de noțiunile de *pI* și pH_i.

Punctul izoionic (pI). O soluție de proteină care conține numai ionii proteinei și apei se numește *soluție proteică izoionică*. Se obține fie prin trecerea proteinei pe coloane cu anioniți și cationiți (rezine schimbătoare de ioni mixte) care reține toți ionii străini, fie prin dializă față de apă distilată. pH-ul soluției izoionice se numește punct izoionic (*pI*). Deoarece electroneutralitatea cere ca $[H^+] + [P]^{-}Z = [OH^-]$, o soluție izoionică este și izoelectrică numai în cazul particular cînd $pH_i = \mathrm{pH}\ 7$; *pI* este funcție de concentrația proteinei $[P]$ și pentru soluțiile foarte diluate de proteine, tinde spre 7.

Pentru aprecierea *capacității de combinare maximă cu acizii sau bazele* se consideră proteina la *pI*, reprezentînd (simplificat) numai grupările carboxilice, imidazolice și aminice:

$$\underbrace{COO^-\ COO^-\ COO^-\ldots COO^-}_{\text{grupări acide „încărcate"}}\quad \underbrace{N\ldots..N}_{\text{grupări bazice „neîncărcate"}}\quad \underbrace{NH^+\ NH_3^+\ldots NH_3^+\ NH_3^+\ NH_3^+}_{\text{grupări bazice „încărcate"}}$$

La *pI* există, prin definiție, atît grupări anionice cît și cationice. Prin adăugare progresivă de acid, primii protoni se fixează pe grupările bazice neîncărcate (imidazol), apoi pe $-COO^-$; numărul de protoni fixați crește pînă cînd toate grupările $-COO^-$ devin COOH; numărul final este egal cu a totalității grupărilor

bazice ale proteinei. Cînd se adaugă baze, $—OH^-$ introduşi se combină cu toţi protonii fixaţi pe grupările bazice încărcate, formînd apă. Deoarece în soluţia izoionică grupările acide sînt egale cu cele bazice rezultă că numărul grupărilor OH^- este egal cu acela al carboxililor. Pentru determinarea numărului de protoni fixaţi, după adăugarea unei anumite cantităţi de acid, se măsoară pH-ul, care arată activitatea $[H^+]$ din care se poate calcula concentraţia $[H^+]$ a protonilor liberi, dacă se cunoaşte *coeficientul de activitate* γ_{H^+}. Diferenţa dintre $[H^+]$ astfel găsit şi concentraţia rezultată din acidul utilizat, în cazul cînd nu ar fi existat proteina, dă cantitatea de protoni fixată ; la fel se procedează şi pentru calcularea cantităţii de OH^- fixaţi, dar, în ambele cazuri valoarea γ_{H^+} este greu de determinat în prezenţa proteinei.

Punctul izoelectric al proteinelor (pH_i). În cursul titrării unei proteine apare un pH la care încărcarea (aparentă) este zero ; acest pH, la fel ca pentru aminoacizi, se denumeşte *punct izoelectric sau pH_i*, şi se apreciază experimental prin lipsa de migrare în cîmpul electric. pH_i al unei proteine poate fi evaluat cu aproximaţie din datele cu privire la compoziţia în aminoacizi. Valoarea pH_i este o caracteristică a fiecărei proteine, fiind situat, în majoritatea cazurilor în domeniul neutralităţii, ceea ce reflectă un număr aproximativ egal de aminoacizi cu caracter acid şi cu caracter bazic, dar poate fi situat şi în domeniul acid sau bazic *(tabelul 1.25)*

TABELUL 1.25

Valoarea punctului izoelectric al unor proteine

Proteine	pH_i	Proteine	pH_i
Protamine		*Fosfoproteine*	
Salmină	12,1	α-Caseina	4,0—4,1
Sturină	11,7	β-Caseina	4,5
Histone		γ-Caseină	5,8—6,0
Globina umană	7,5	*Mucoproteine*	
Albumine		α-Ovomucoid	3,8—4,4
Ovalbumină	4.6—4,7	α_1-Mucoproteide	1,8—2,7
Serumalbumină	4,7—4,9	Lizozim	11,0
Mioalbumină	3,5	*Cromoproteide*	
Globuline		Mioglobina	7,0
β-Lactoglobulină	5,3	Hemoglobina (om)	7,07
γ_1-Globulină umană	5,8	Hemoglobina (găina)	7,23
	6,6	Hemoglobina (cal)	6,92
γ_2-Globulină umană	7,3	Citocrom c	9,8—10,1
	8,2	*Lipoproteide*	
Miozina A	5,2—5,5	Tromboplastină	5,2
Siderofilina	5,9	α_1-Lipoproteină	5,5
Fibrinogen	5,5—5,8	β_1-Lipoproteină	5,4
		β-Lipovitelina	5,9
Scleroproteine		*Nucleoproteide*	
Keratine	3,7—5,0	Timonucleohistonă	4
Colagen	6,6—6,8	Virus vaccinal	5,3
Gelatina	4,7—5,0		

Cunoaşterea pH_i este importantă atît în scop analitic, pentru caracterizarea unei proteine, cît şi preparativ, deoarece la acest pH proteinele au solubilitatea minimă (favorizează precipitarea).

Proprietăţile tampon ale proteinelor. Pe baza prezenţei simultane în molecula proteinelor a diferitelor tipuri de aminoacizi cu disocierea la pH-uri variate, o

Scanned with OKEN Scanner

Scanned with OKEN Scanner

anumită proteină manifestă un efect tampon într-un domeniu extins de pH, de obicei între 2—13. Efectul tampon în domeniul pH-ului majorității celulelor (pH 6—7,5) se datorește aproape exclusiv imidazolului din molecula His, care acoperă domeniul de pH 5,6—7,0; în alte cazuri, de exemplu, în sucul gastric, puternic acid, sînt de interes grupările —COOH libere (Asp, Glu).

Heteropolaritatea proteinelor. Dipolmomentul. Funcțiile polare, ca de exemplu, $-NH_2$, —COOH, $-CONH_2$, —OH, —SH, electropozitive sau electronegative, conferă proteinei sarcini electrice repartizate neuniform, cu o asimetrie a sarcinilor în molecula proteinei și o anumită capacitate de acțiune electrostatică, exprimată prin noțiunea de „dipolmoment" *(Debye)*. De exemplu, dacă o moleculă are două sarcini, una + și una —, acestea se găsesc la o anumită distanță, *d*, una de alta:

$$e^{+} \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; . \; e^{-}$$
$$x \leftarrow\!\!\text{———————}\; d \;\text{———————}\!\!\rightarrow x$$

Se definește ca *dipol-moment* (μ) produsul dintre sarcină și distanță: $\mu = d \times e$; reprezentînd în unități elementare de electricitate $4{,}8 \times 10^{-10}$ u.e. și distanța în Å (= 10^{-8} cm) vom avea: $\mu = 4{,}8 \times 10^{-10} \times 10^{-8} = 4{,}8 \times 10^{-18}$ u.e. în *unități Debye*. Dipolmomentul proteinelor reprezintă suma dipolmomentelor „elementare" (ale aminoacizilor componenți) și *d* are dimensiuni mari, de aceea valorile sale sînt de 10—100 ori mai mare decît pentru aminoacizi *(tabelul 1.26)*

Dipolmomentul prezintă importanță pentru schimburile cu ionii și cu alte molecule proteice sau nonproteice și pentru solubilitate.

Interacțiunea proteinelor cu ionii mici și cu unele molecule. Proteinele pot lega diferiți ioni și molecule, cu intensități diferite, în dependență de natura proteinei și a părții legate. Astfel, de exemplu, cationii: Ca, Mg, Cu, Fe, Mn, Zn, Co, Ag, Hg se leagă ușor, Na și K mai greu. Alcalinoteroasele se leagă ionic, în special cu grupările $-COO^-$ (sau cu fosfații, cînd aceștia sînt prezenți); metalele grele se leagă cu —SH sau dau complecși stabili (chelați) cu grupările $-COO^-$, $-NH_2$, cu imidazolul (ca liganzi). Anionii formează legături ionice cu grupările cationice din proteine. Capacitatea proteinelor de a lega ionii este de mare importanță pentru transportul acestora în sînge și pentru activitatea enzimelor, precum și pentru alte procese. Gradul de legare depinde de numeroși factori, ca mărimea și natura moleculei proteice, concentrația și sarcina proteinei și ionului în cauză, pH etc.; de exemplu, cantitatea de NaCl legată este mare la lizozim, mijlocie la albuminele de ou și mult mai mică la γ-globuline și, în general, crește cu scăderea pH-ului. Explicația prin afinitatea mai mare a Cl^- pentru forma cationică a proteinei nu se poate generaliza deoarece proteinele pot lega și ioni (sau molecule) cu sarcină identică, de exemplu, legarea metiloranjului cu albumina serică bovină crește cu pH-ul în domeniul de pH de la 6,4 la 7,6; de asemenea ionii multivalenți sînt mai

TABELUL 1.26

Dipolmomentul unor compuși

Compuși	*Unități Debye*
Apa	1,8
Glicina	15,0
Glicil-glicina	28,0
Insulina	310,0
Albumina serică	380,0
Oxihemoglobina	480,0
γ-Globulina	1.100,0
Edestina	1.400,0

intens legaţi decît cei monovalenţi şi ionii mari (metilorange, dodecilsulfat) mai puternic decît cei mici (NaCl). Pentru o proteină (P), care are n locuri de legare cu un anumit ion (A), apar n constante de echilibru:

$$K_1 = \frac{|PA|}{|P||A|}\ ;\ K_2 = \frac{|PA_2|}{|PA||A|}\ ;\ \ldots\ldots\ K_n = \frac{|PA_n|}{|PA_{n-1}||A|}$$

Considerînd situaţia în care fiecare loc de legare ar fi independent şi neinfluenţat de către ceilalţi, deci că afinitatea fiecărui loc pentru A este identică, se ajunge la formularea: $K_1 = nK$, în care K este *constanta de echilibru intrinsec* pentru fiecare loc. Pe baza acestor formulări se poate stabili o relaţie între A şi r (= proporţia moleculelor de A legate de către totalitatea moleculei de proteină):

$$r = \frac{\text{Molecule de } A \text{ legate}}{\text{Totalitatea moleculelor de proteină}} \text{ sau } \frac{r}{|A|} = K_n - K_r$$

Reprezentarea grafică a raportului $r/(A)$ dă o dreaptă a cărei intercepţie cu axa r exprimă mărimea lui n şi cea care interceptează axa $r/(A)$ dă mărimea K_n şi permite astfel evaluarea simultană pentru K şi n. Gradul legării ionilor de către o proteină se poate determina experimental prin *echilibrul de dializă*, utilizînd un vas prevăzut cu o membrană impermeabilă pentru proteină dar permeabilă pentru ionul în cauză. Într-un compartiment se introduce soluţia proteică şi în celălalt soluţia ionică (de concentraţie cunoscută); după echilibrare se determină ionul din compartimentul fără proteină şi se calculează, prin diferenţă, cantitatea de ion care a difuzat în compartimentul cu proteina.

Proteinele pot lega şi molecule neutre, de exemplu, steroizi, bilirubină, prin atracţii dipolare, şi legături *London-van der Waals*. Interes deosebit prezintă legarea la proteine a acidului sulfosalicilic, tricloracetic, a alchilsulfonaţilor etc., utilizaţi în precipitarea proteinelor; legăturile din sistemele antigeni-anticorpi, şi legarea *medicamentelor*, componentă importantă a *farmacocineticii* (unele aspecte vor fi prezentate în detaliu în alte părţi).

1.3.3.4. *PROPRIETĂŢILE DE SOLUBILITATE ALE PROTEINELOR*

Dizolvarea unui corp (C) într-un solvent (S) se produce atunci cînd forţele de atracţie dintre moleculele C şi S sînt superioare forţelor de asociere ale moleculelor C. În cazul proteinelor, aceste forţe de coeziune sînt reprezentate, pe de o parte, de atracţiile „culombiene pure" (interacţiunile între două grupări cu sarcini opuse, de exemplu, $-COO^-$ şi $-NH_3^+$ sau cele dintre dipolii permanenţi, de exemplu, legăturile de H) şi, pe de altă parte, de atracţiile van der Waals. Solubilitatea unei proteine este astfel condiţionată, în special, de repartiţia şi proporţia grupărilor polare (hidrofile) şi apolare (hidrofobe) ale aminoacizilor componenţi şi depinde, hotărîtor, de prezenţa sărurilor neutre (forţa ionică), pH etc. *Forţa ionică*, $\mu = 1/2\ \Sigma c_i Z_i^2$, în care c_i = concentraţia componentului i şi Z = sarcina sa. Solubilitatea creşte cu forţa ionică; pentru concentraţii ionice slabe, atinge un maxim, apoi scade, pentru a se anula (sau devine neglijabilă) pentru concentraţii saline ridicate.

Scanned with OKEN Scanner

Coeficientul de activitate, γ, pentru un ion dat, se corelează cu forța ionică prin relația: $-\log \gamma = \frac{1{,}81 \times 10^6}{D^{3/2} T^{3/2}} Z_1 Z_2 \sqrt{\mu}$ unde D = constanta dielectrică a mediului și Z_1 și Z_2 = sarcinile ionului și ale ionilor din mediu.

Influența pH-ului. Solubilitatea proteinelor este minimă la punctul lor izoelectric (pH_i). Reprezentarea solubilității majorității proteinelor, la putere ionică constantă, în raport de pH dă o curbă în formă de „U". Explicația acestei comportări rezultă din faptul că la pH_i repulsiile intermoleculare electrostatice între moleculele substanței dizolvate sînt minime și forțele de formare a rețelei cristaline, maxime. Există și numeroase excepții de la curba în formă de „U", de exemplu, înregistrarea unui „dublu minim", mai dificil de explicat.

Efectul dizolvant („salting-in effect"). La concentrații saline slabe, logaritmul solubilității crește proporțional cu forța ionică. Acest efect dizolvant se explică prin faptul că atracțiile electrostatice dintre amfioni sînt mult reduse în prezența sărurilor neutre în cantitate mică (unele proteine, de exemplu, globulinele, precipită prin scăderea forței ionice a soluției, — prin dializă); în absența sărurilor, solubilitatea proteinelor este minimă la pI deoarece forțele de coeziune sînt maxime în cazul disocierii egale a grupărilor acide și bazice; la fel, în prezența concentrațiilor saline mici, solubilitatea este minimă în jurul pH_i (fig. 1.54).

Efectul de salefiere („salting-out effect"; relargare).

Solubilitatea proteinelor crește cu forța ionică a mediului numai într-o zonă limitată a concentrației saline; peste o anumită limită, sărurile, stabilizează proteinele prin scăderea valorii coeficientului de activitate al grupelor ce poartă sarcini, solubilitatea lor scade rapid și astfel ele pot fi precipitate prin săruri *(salefiere, relargare)*, probabil ca rezultat al competiției dintre proteine și ionii sărurilor pentru moleculele de apă necesare solvatării; la concentrații suficient de ridicate de săruri, moleculele de apă sînt insuficiente pentru solubilizarea completă a proteinei, grupările sale hidrofile se deshidratează și interacțiunea proteină-proteină este mai puternică decît cea proteină-apă, ceea ce duce la precipitarea proteinei. În acest domeniu al concentrației saline apare o relație matematică între variațiile solubilității proteinei și concentrația sărurilor din mediu (*E. J. Cohn*, 1925, 1950): $\log S = \beta' - K'_S \mu$, în care S = solubilitatea porteinei (g/litru); μ = forța ionică; β' = valoarea log S pentru $\mu = 0$ (log solubilității ipotetice la forța ionică zero); K'_S = constanta de relargare a lui Debye. La pH și t_0 constantă, log solubilității este funcție de concentrația salină sau, cu alte cuvinte, *variația solubilității (S) a unei proteine pure este funcție exponențială a concentrației saline*, variații mici ale forței ionice producînd schimbări remarcabile în solubilitatea proteinei *(figura 1.54)*.

Efectul de relargare a proteinelor, adică precipitarea lor prin săruri neutre ($NaCl$, $MgSO_4$, Na_2SO_4, $(NH_4)_2SO_4$); fosfați mono- și dipotasici este una dintre metodele „clasice" de obținere a proteinelor (prin fixarea corespunzătoare a concentrației saline) și servește la stabilirea *curbelor de relargare* a unui amestec de proteine în care, teoretic, n proteine pure dau n segmente de curbă *(J. Roche, Y. Derrien, 1948, 1954)*.

Formarea sărurilor puțin solubile (cloruri, sulfați) a cationilor proteici în zona acidă față de pH_i a fost de mult timp utilizată pentru izolarea unor proteine (*T. B. Osborne, I. F. Harris*, 1905); formarea sărurilor proteice cu anioni complecși și grei: tungstat, fosfotungstat, silicotungstat, sulfoacetat, acid tricloracetic, acid picric, metafosfat, perclorat etc. sînt metode de rutină pentru eliminarea proteinelor din soluții (de exemplu, „deproteinizarea" serului).

Scanned with OKEN Scanner

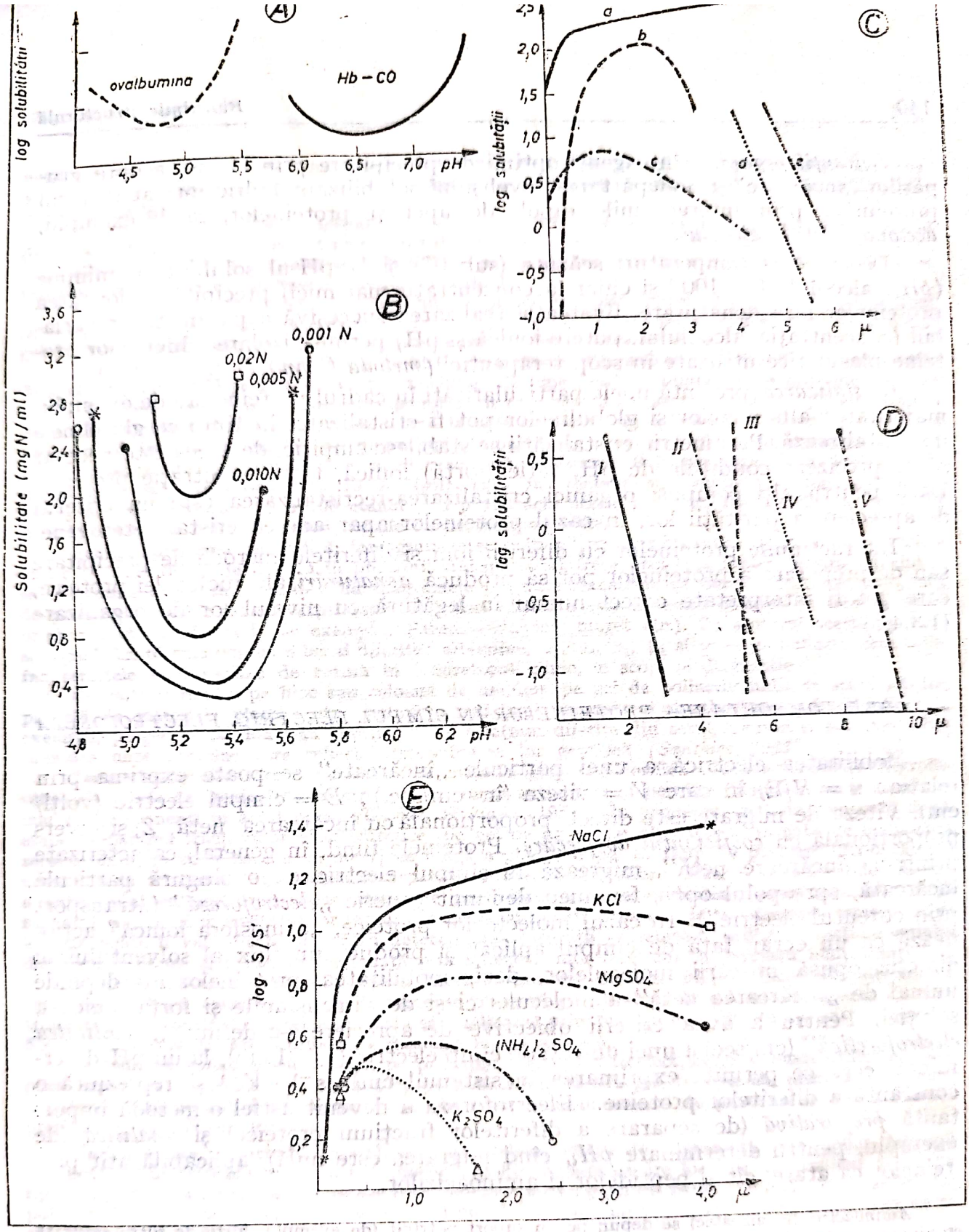


Fig. 1.54. Dependența solubilității unor proteine în funcție de pH și forța ionică (μ). *A.* Solubilitatea ovalbuminei și carboxihemoglobinei (Hb—CO) în dependență de pH *(S. M. Rapoport, 1969). B.* Solubilitatea β-lactoglobulinei în raport de pH și concentrația în NaCl *(A. Gränwall, 1942). C.* Solubilitatea în dependență de μ a hemoglobinei în NaCl (a), edestinei în Na_2SO_4 (b), caseinei în NaCl (c), pseudoglobulinei în $(NH_4)_2SO_4$ (d) și albuminei în $(NH_4)_2SO_4$ (e) *(după S. M. Rapoport, 1969* și *E. Hoffman, 1975). D.* Solubilitatea în prezență de $(NH_4)_2SO_4$ de diferite concentrații: fibrinogen (I), hemoglobină (II), pseudoglobulină (III), serumalbumină (IV), mioglobină (V) *(după C. Cotin, J. T. Edsall). E.* Solubilitatea carboxihemoglobinei izoelectrice în funcție de forța ionică (μ) și natura ionilor *(după A. A. Green).*

Solvenţii organici sînt agenţi optimi de precipitare prin efectul asupra grupărilor „încărcate" şi îndepărtarea învelişului solubilizant hidric format în jurul proteinelor prin interacţiunile dipol ale apei şi proteinelor, ca de exemplu, *acetona, eterul, alcoolul.*

Deoarece la temperaturi scăzute (sub 0°) şi la pH-ul solubilităţii minime (pH_i) alcoolul (40—100° şi chiar la concentraţii mai mici) precipită majoritatea proteinelor fără denaturare, fixarea şi realizarea succesivă a parametrilor variabili (concentraţia alcoolului, putere ionică şi pH) permite izolarea diferitelor proteine plasmatice utilizate în scop terapeutic *(metoda Cohn).*

Cristalizarea prezintă unele particularităţi în cadrul proteinelor, de exemplu, majoritatea albuminelor şi globulinelor pot fi cristalizate, în timp ce glutelinele nu cristalizează. Parametrii cristalizării se stabilesc empiric, de aceea este necesar să se precizeze condiţiile de pH, tărie (forţă) ionică, t°, concentraţie proteică. Dacă pentru alţi compuşi organici cristalizarea-recristalizarea este un criteriu de apreciere a purităţii lor, în cazul proteinelor apar adesea cristale eterogene.

Interacţiunile proteinelor cu diferiţii ioni şi diferitele metode de precipitare sau de preparare a proteinelor pot să producă *denaturări* ale moleculei proteice, care pot fi interpretate corect numai în legătură cu nivelul lor de organizare (1.3.4.5)

1.3.3.5. *COMPORTAREA PROTEINELOR ÎN CÎMPUL ELECTRIC. ELECTROFOREZA*

Mobilitatea electrică a unei particule „încărcate" se poate exprima prin relaţia: $u = V/E$, în care V = viteza (în cm/sec.); E = cîmpul electric (volţi/cm). Viteza de migrare este direct proporţională cu încărcarea netă, Z, şi invers proporţională cu *coeficientul de frecare.* Proteinele fiind, în general, caracterizate printr-o „încărcare netă", migrează în cîmpul electric ca o singură particulă încărcată, spre polul opus, fenomen denumit generic *„electroforeză"* („transport prin curentul electric"). În cazul moleculelor proteice, „atmosfera ionică" acţionează ca un ecran faţă de cîmpul aplicat şi produce un flux al solventului în direcţia opusă mişcării moleculelor, deci, mobilitatea proteinelor nu depinde numai de „încărcarea netă" a moleculei ci şi de dimensiunile şi forţa ionică a soluţiei. Pentru a avea criterii obiective de apreciere s-a definit *„mobilitatea electroforetică"* (cm/sec) a unei unităţi de cîmp electric (1 V/1 cm), la un pH determinat, ceea ce permite exprimarea în sistemul $cm^2 \cdot s^{-1} \cdot V^{-1}$ şi reprezintă o constantă a diferitelor proteine. Electroforeza a devenit astfel o metodă importantă *preparativă* (de separare a diferitelor fracţiuni proteice) şi *analitică* (de exemplu, pentru determinare pH_i, cînd migrarea este nulă), aplicabilă atît proteinelor ca atare, cît şi peptidelor şi aminoacizilor.

Aminoacizii (în amestec) se depun pe un suport potrivit (de exemplu, hîrtie de filtru saturată cu un tampon în soluţie apoasă). La pH neutru, sub efectul curentului electric, Glu şi Asp migrează spre anod şi His, Liz, Arg spre catod. Prin schimbarea pH-ului se poate modifica adecvat migrarea aminoacizilor, permiţînd separarea mai avansată.

Peptidele, prin iontoforeză într-un aparat cu patru compartimente, echipat cu membrane de celofan sau gelatină formalizată, se pot separa în trei grupe: acide, neutre şi bazice.

În domeniul *proteinelor*, electroforeza este deosebit de importantă în scopuri analitice şi preparative, deoarece proteinele la un pH mai acid decît pH_i se comportă ca o bază (cation) şi migrează spre catod, şi, invers, în mediu mai bazic decît pH_i. În practică se preferă utilizarea unor tampoane care au pH-ul mai mare decît pH_i al proteinelor din amestec, de exemplu, pentru separarea protei-

nelor plasmatice se utilizează tampoane cu $pH = 8,6$; deşi toate proteinele migrează în acelaşi sens, apar *fracţiuni distincte*, datorită vitezei de migrare electroforetică, o caracteristică importantă a diferitelor proteine.

Electroforeza proteinelor, iniţiată de *Tiselius (1937)* se utilizează, după scopul urmărit, în două variante principale: electroforeza *liberă* (în coloană de lichid) şi *de zonă* (pe diferite suporturi).

Electroforeza liberă, în coloană de lichid, se poate efectua într-un vas în formă de „U" şi se înregistrează frontul de migrare al fiecărei fracţiuni.

Electroforeza de zonă diferă, în principiu, de precedenta prin faptul că ionii nu se mişcă liber în soluţie; prin utilizarea unui „suport" de exemplu, celuloză sau derivaţi ai ei, bloc de amidon, gel de poliacrilamidă etc. fracţiunile migrate se reţin la locuri bine stabilite.

În *electroforeza pe hîrtie*, pe benzi de hîrtie de filtru de dimensiuni potrivite, se depune soluţia de analizat (ca o bandă perpendiculară pe axul lung), se umectează cu tampon şi se introduc capetele hîrtiei în două bacuri care conţin tamponul şi în care se găsesc electrozii; instalaţia este izolată de mediul ambiant. După migrare se relevă benzile ce corespund diferitelor fracţiuni cu coloranţi (utilizaţi şi în cromatografie) ca de exemplu, albastru de bromfenol (0,1% în etanol saturat cu $HgCl_2$); azocarmin B (metanol: ac. acetic: sol. sat. azocarmin B în proporţie de 5 : 1 : 4); negru de naftalen sau Amidoschwartz 10 B (sol. sat. în metanol/ac. acetic); verde „Brillant" (0,5% în apă ce conţine 25 p 100 etanol şi 5 p 100 acid acetic pur) etc. După spălarea excesului de colorant rămîn colorate numai benzile de proteine separate.

Pentru aprecierea *cantitativă*, foreogramele se „citesc" cu ajutorul unor instrumente (densitometre); banda de hîrtie (făcută în prealabil transparentă) trece prin faţa fantei densitometrului şi se determină absorbţia luminii. Din diagramele obţinute se calculează fiecare fracţiune, în % faţă de proteinele totale; pentru exprimarea în valori absolute este necesară dozarea proteinelor totale printr-o metodă adecvată (de exemplu, Parnas—Wagner, biuret etc.). Cu ajutorul acestei metode se separă din plasma umană 6 benzi diferite: albumine, α_1, α_2, β_1, β_2 şi γ — globulinele, care satisfac cerinţele unei analize de rutină în laboratorul clinic, în scop de diagnostic.

Celelalte variante, pe bloc sau coloană de amidon, pe gel de poliacrilamidă, în strat subţire, pe folii de materiale plastice etc., permit o mai bună separare şi standardizare a fracţiunilor; de exemplu, pe gel de amidon s-au obţinut 20 de fracţiuni diferite din serul sanguin şi s-a identificat prezenţa unor proteine care reflectă determinarea lor genetică *(Smithies, 1955)*.

Imunoelectroforeza este o perfecţionare metodologică ce valorifică atît caracteristicile electroforetice cît şi cele antigenice (de exemplu, cu ser imun antiuman) şi permite ilustrarea unui mare număr de componenţi în serul uman *(Grabar, Williams, 1953)*. În principiu, metoda comportă două etape: separarea fracţiunilor electroforetice, pe gel de agar (sau alt suport), urmată de depunerea serului imun, în strat paralel cu marginea lungă a plăcii; după un timp de păstrare într-o cameră umedă şi la t° constantă, fracţiunile separate difuzează (cu viteze diferite) şi la locul de întîlnire a antigenului cu anticorpul apar arcuri de precipitare (care se evidenţiază prin colorare); după numărul, poziţia şi intensitatea lor se pot aprecia fracţiuni de proteine de un deosebit interes clinic Metoda poate fi valorificată şi pentru determinarea purităţii proteinelor, utilizînd fracţiuni definite din serurile imune şi a fost perfecţionată prin folosirea unor fracţiuni cu derivaţii fluorescenţi.

Metoda *focalizării izoelectrice* separă diferitele proteine pe baza pH_i, utilizînd amfoliţi-suport, care împreună cu eşantioanele de proteine se plasează pe un strat de gel într-un aparat de electroforeză-disc; zonele de proteine separate se localizează prin precipitarea directă cu ac. tricloracetic 5% sau cu coloranţi. Are o putere de rezoluţie foarte ridicată.

Metoda *imunofocalizării electrice*, pe principiul focalizării izoelectrice şi al imunodifuziunii, implică separarea proteinelor pe baza pH_i pe poliacrilamidă sau gel de agaroză, urmată de imunodifuziunea faţă de antiseruri potrivite; se obţin astfel în amestecuri de proteine arcuri de imunoprecipitine, la pH_i-ul fiecăreia.

Izotachoforeza, o metodă recentă, impune aceleaşi viteze de migrare tuturor ionilor, folosind ioni potriviţi de separare, în cazul proteinelor amfoliţi. Separarea are loc într-un gradient de amfoliţi transportori care migrează *izotachoforetic*, de exemplu, în gelul de poliacrilamidă. Alegerea ionilor potriviţi de distanţare permite obţinerea unui număr de fracţiuni mai mare decît în metodele anterior descrise.

1.3.3.6. *CARACTERUL COLOIDAL AL SOLUŢIILOR PROTEICE*

Soluţiile de proteine prezintă toate proprietăţile generale ale stării coloidale: fenomenul *Tyndall*, presiunea osmotică redusă, puterea de difuziune mică, migrarea în cîmpul electric, ultrafiltrarea, echilibrul de membrană al lui *Donnan*

etc. Ele sînt de mare interes în realizarea funcţiilor biologice, pentru caracterizarea lor (de exemplu, determinarea greutăţii moleculare) şi în comportarea faţă de radiaţiile vizibile şi invizibile.

1.3.3.6.1. DETERMINAREA GREUTĂŢII MOLECULARE A PROTEINELOR

Determinarea gr. mol. a proteinelor este o problemă dificilă ce necesită considerarea unor aspecte foarte complexe. Metodele uzuale pentru determinarea gr. mol. a moleculelor mici, în special ridicarea punctului de fierbere, scăderea punctului de congelare sau măsurarea presiunii de vapori sînt inaplicabile proteinelor. Astfel, de exemplu, pentru a obţine o scădere a punctului de congelare al apei cu 0,1 °C, cu o proteină cu gr. mol. de 100.000 ar fi necesar ca soluţia să conţină peste 5 kg proteină/litru ; în cazul proteinelor nu se poate ajunge la p.f. sau la alte condiţii cerute de măsurarea presiunii de vapori, deoarece ele nu rezistă la asemenea temperaturi şi de aceea se aplică metode bazate pe principii diferite.

Presiunea osmotică. Dacă de o parte a unei membrane impermeabilă pentru proteine se aduce o soluţie de proteină (P) şi de cealaltă parte un solvent, pentru care membrana este permeabilă, o parte din moleculele acestuia vor trece spre soluţia proteică, pînă la atingerea „stării de echilibru". Presiunea observată este superioară celei exercitată de solventul pur (măsurată de exemplu, cu un osmometru) ; excedentul de presiune se numeşte *presiune osmotică* (π).

Pentru un sistem cu doi componenţi, presiunea osmotică π este legată de concentraţia m (moli/litru) prin legea lui *van't Hoff* (I) sau exprimată în termenii gr. mol., M, şi a concentraţiei, c, în g pe litru (II) :

$$\text{(I)} \quad \lim_{m \to 0} \frac{\pi}{m} = RT ; \qquad \text{(II)} \quad \lim_{c \to 0} \frac{\pi}{RTc} = \frac{1}{M}$$

Aceste relaţii servesc determinării gr. mol. a proteinelor, prin măsurarea presiunii osmotice, valorile c, T şi π fiind determinate experimental. Stabilirea valorii limită π/RTc necesită măsurarea presiunii osmotice la un număr mare de concentraţii diferite şi extrapolarea la concentraţia de zero. Asemenea determinări sînt laborioase şi de aceea se recurge la o altă formă de apreciere a presiunii osmotice, în termenii unei serii în raport de c :

$$\frac{\pi}{RTc} = \frac{1}{M} + Bc + Cc^2 + \ldots \pi$$

în care coeficienţii se determină din măsurarea lui π, funcţie de c. În acest caz, M se poate calcula fără extrapolarea concentraţiei la 0.

Metoda nu dă informaţii asupra purităţii produsului şi de aceea în cazul preparatelor care conţin proteine cu gr. mol. diferite se determină numai presiunea osmotică medie şi, deci, numai gr. mol. medie : $\overline{M}_n = \frac{\Sigma c_i}{\Sigma c_i / M_i}$ în care c_i = concentraţia componentului i şi M_i = greutatea sa moleculară. În cazul cînd proteina are o sarcină netă (aşa cum se întîmplă de obicei), măsurarea presiunii osmotice dă valori pentru π mai mici decît cele reale, datorită efectului *Gibbs-Donnan* (a se vedea *1.3.3.6.2*).

Scanned with OKEN Scanner

Microscopia electronică. Electronomicroscopia, cu o putere de rezoluție optică de 20Å, permite detectarea (fotografierea) directă a proteinelor, deoarece majoritatea acestora au dimensiunile minime peste 20Å. Cunoscînd numărul particulelor pe un cîmp dat al imaginii electronomicroscopice, volumul soluției inițiale din care s-au obținut și greutatea uscată a proteinei/ml, se poate calcula greutatea moleculară. Dificultățile întîmpinate la determinarea numărului de particule se pot înlătura prin adăugarea prealabilă a unui număr cunoscut de particule de latex de polistiren, care servesc astfel ca element de referință. Metoda dă rezultate foarte bune pentru determinarea gr. mol. a acizilor nucleici, deoarece există o relație matematică între lungimea moleculei și greut. mol: 1Å sare de Na a ADN corespunde la o gr. mol. de 200 daltoni.

Difuzia luminii. Orice lichid, chiar cînd aparent este perfect limpede, produce o difuzie a luminii, care este intensificată prin prezența substanțelor dizolvate. Proiectînd un fascicul de lumină paralelă pe un volum definit de lichid și determinînd raportul intensității luminii difuzate în diferite direcții, față de intensitatea luminii incidente, se constată că intensitatea difuziei crește în paralel cu dimensiunile particulelor din soluție și că aceasta nu este identică în toate direcțiile, dacă particulele sînt destul de mari. Calcularea relațiilor dintre difuziune și mărimea, forma și greut. mol. se poate face pe baza teoriilor „moleculare" sau „statistice". Prima categorie consideră difuziunea produsă de o moleculă unică (soluții foarte diluate) și se bazează pe proprietățile geometrice și dielectrice ale moleculelor; a doua categorie admite că difuziunea rezultă din fluctuațiile moleculelor dintr-o unitate de volum, cărora li se aplică principiile calculului statistic.

Cu ajutorul unor aparate alcătuite, în general, dintr-o sursă de lumină monocromatică, o cuvă pentru soluție și un fototub (cu celulă fotoelectrică) rotator, este posibilă măsurarea intensității luminii la diferite unghiuri și aplicînd formule de calcul complicate, se pot obține date interesante cu privire la dimensiuni și gr. mol.

Difracția razelor X. La fel ca în cazul luminii vizibile, diferitele particule (molecule) produc și difracția razelor X; în acest caz dimensiunile moleculelor sînt mai mari decît lungimea de undă a razelor X(1—2 Å). Metoda, în diferite variante tehnice, oferă date foarte prețioase și precise cu privire la dimensiunile, forma (sferică, cilindrică, bastonașe, discuri), greutatea moleculară și în stabilirea structurii terțiare a proteinelor (vezi 1.3.4.3).

Viteze de sedimentare. Ultracentrifugarea. Una dintre cele mai exacte și utilizate metode pentru determinarea gr. mol. a proteinelor este *ultracentrifugarea,* bazată pe urmărirea vitezei de sedimentare a particulelor dintr-un sistem eterogen, sub acțiunea unui cîmp centrifugal. Proteinele sedimentează în tubul de centrifugă, în raport de mărimile lor moleculare; greutatea moleculară se calculează după formula:

$$M = \frac{RT \ln x_2/x_1}{\omega^2 D(1 - V_S \cdot \rho_0)(t_2 - t_1)}$$

în care M = gr. mol.; R = constanta gazelor; T = temperatura absolută; $x_2 \rightarrow x_1$ = distanța parcursă de stratul care sedimentează în intervalul de timp $t_2 - t_1$, pe direcția de acțiune a forței centrifuge; ω = viteza unghiulară; D = constanta de difuziune; V = volumul specific al proteinelor; ρ_0 = densitatea soluției.

O metodă mai simplă, tot pe baza sedimentării centrifugale, foloseşte relaţia $M = \frac{R.T.S}{D(1 - V_S \cdot \rho_0)}$ în care S = o caracteristică generală numită „constanta de sedimentare" ce reprezintă viteza de sedimentare într-un cîmp centrifugal C.G.S., egală cu $dx/dt/\omega^2 x_1$, unde dx/dt = viteza de sedimentare; ω = viteza unghiulară; x = distanţa proteinei faţă de axul centrifugii şi se exprimă în *unităţi Swedberg* (1 U. Swedberg = 10^{-13} secunde).

Alte metode pentru determinarea greutăţii moleculare a proteinelor. Din datele analitice cu privire la *un anumit aminoacid*, care se găseşte cu certitudine în proporţie de 1 mol/1 mol proteină se poate calcula gr. mol. a respectivei proteine. Rezultate mai bune se obţin în cazul proteinelor care conţin ioni metalici, de exemplu, hemoglobina conţine 0,335% fier, din care prin relaţia: $(55,85/0,335) \times \times 100 = 16,700$; în realitate, hemoglobina are 4 atomi Fe/mol de unde apare gr. mol. reală, în jur de 66.800.

„Sitele moleculare" (vezi 1.3.3.2), cu diferite caracteristici de fabricaţie, servesc de asemenea pentru determinarea, în condiţii destul de simple, a greutăţii moleculare a proteinelor.

În *tabelul 1.27* se prezintă greutăţile moleculare ale unor proteine, obţinute prin metode diferite.

TABELUL 1.27

Greutatea moleculară a unor peptide şi proteine

	gr. mol		*gr. mol*
Insulina	5.800	Albumina serică (bovină)	66.500
	12.000	Albumina serică (om)	69.000
Citocromul c	13.000	Hemoglobină	68.000
Ribonucleaza	13.700	γ-Globulină serică	160.000
Lizozimul	14.400	Catalaza	250.000
Mioglobina	17.000	Fibrinogen	450.000
Tripsina	23.800	Tireoglobina	630.000
Pepsina	35.000	Hemocianina (din Octopus)	2.800.000
Ovalbumina (găină)	44.000	Virusul mozaicului tutunului	17.000.000
Hormonul de creştere (bou)	49.000		

1.3.3.6.2. ECHILIBRUL DE MEMBRANĂ DONNAN

Problema „echilibrului de membrană a lui Donnan" prezintă un interes biologic larg (de exemplu, în legătură cu formarea edemelor) şi are aplicaţii practice în determinarea greutăţii moleculare a proteinelor.

Prin teoria stabilită pe baze termodinamice *(Gibbs, Donnan)* se explică repartizarea ionilor din două compartimente separate printr-o membrană semipermeabilă, atunci cînd de o parte se găseşte o proteină sub formă de anion (de exemplu, în celulele organismului).

Din *figura 1.55* se vede starea iniţială *a* în care proteinatul de sodiu se găseşte de o parte a membranei şi NaCl de cealaltă; în starea *b*, după stabilirea echilibrului, se observă că ionii de Cl^- şi Na^+ au traversat membrana. Situaţia în cele

Scanned with OKEN Scanner

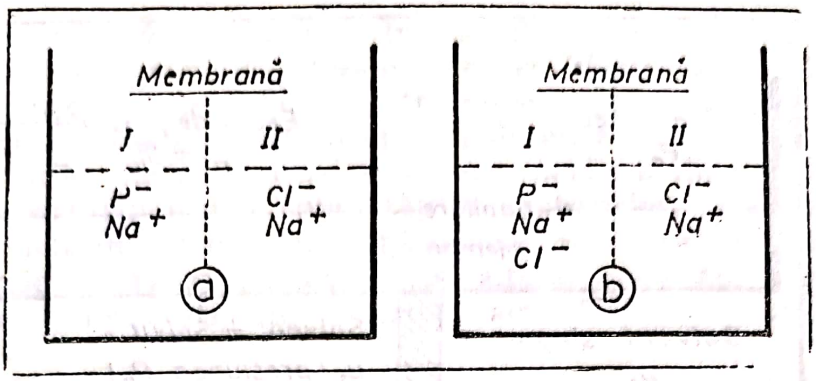


Fig. 1.55. Ilustrarea echilibrului de membrană al lui Donnan. Situaţia iniţială (a) şi după echilibrare (b).

două compartimente I şi II în starea iniţială, *a*, şi după echilibru, *b* este următoarea *a*. $[Na^+] = [P^-] = C_1$ (compartiment I) şi $[Na^+] = (CL^-) = C_2$ (comp. II) *b*. $[Cl^-]_I \cdot [Na^+]_{II} = [Cl^-]_{II} \cdot [Na^+]_{II}$. (ecuaţia I), în care P^- este anionul proteic şi C_1 şi C_2 concentraţiile în compartimentele I şi II. La echilibru, un număr x de molecule de NaCl au difuzat din II în I:

$$[Na^+]_I = C_1 + x; \quad [Cl^-]_I = x; \quad [Na^+]_{II} = [Cl^-]_{II} = C_2 - x$$

Ecuaţia I se poate scrie sub forma: $x(C_1 + x) = (C_2 - x)^2$ de unde rezultă că $x < C_2 - x < C_1 + x$, adică $[Cl^-]_I < [Cl^-]_{II}$ şi $[Na^+]_{II} < [Na^+]_I$. Cu alte cuvinte, la echilibru, în compartimentul I, în care se găseşte proteina, vor fi mai mulţi ioni Na^+ şi mai puţini Cl^- decît în compartimentul II.

În echilibrul Donnan, decisiv este raportul totalului ionilor difuzibili, de o parte şi cealaltă a membranei *(Bénézech)*. Notînd cu S_I şi S_{II} numărul total al ionilor difuzibili, *la echilibru*, în compartimentele I şi II vom avea:

$$S_I = [Cl^-]_I + [Na^+]_I = C_1 + 2x; \quad S_{II} = [Cl^-]_{II} + [Na^+]_{II} = 2C_2 - 2x$$

de unde: $x = \frac{C_{II}^2}{C_1 + 2C_2}$; $S_1 = S_2 = \frac{C_I^2}{C_1 + 2C_2}$

deci $S_1 = S_2$, oricare ar fi C_1 şi C_2; numărul ionilor difuzibil la starea de echilibru este mai mare de partea proteinei (ionul nedifuzibil).

Deoarece concentraţia ionilor este diferită de cele două părţi ale membranei se înregistrează o modificare a presiunii osmotice, datorită diferenţei dintre presiunea osmotică produsă de proteină şi sare, de o parte, a membranei şi numai de sare, de cealaltă parte, deci:

$$\pi = RT\,[m + (Na^+) + (Cl^-) - (Na^+)' - (Cl^-)']$$

reamintind că $\pi' = RTm$; $m = \frac{c}{M}$ şi M = greutatea moleculară. Notînd cu Z sarcina netă a proteinei şi neglijînd concentraţiile $[H^+]$ şi $[OH^-]$, condiţia neutralităţii sarcinilor de o parte şi alta a membranei va fi: $[Na^+] + Zm = [Cl^-]$ şi $[Na^+]' = [Cl^-]'$. Egalitatea produsului dă expresia: $[Cl^-]'$ $[Na^+]' = [Cl^-][Na^+] = [(Na^+) + Zm]\,(Na^+)$. Plecînd de la ecuaţiile de mai

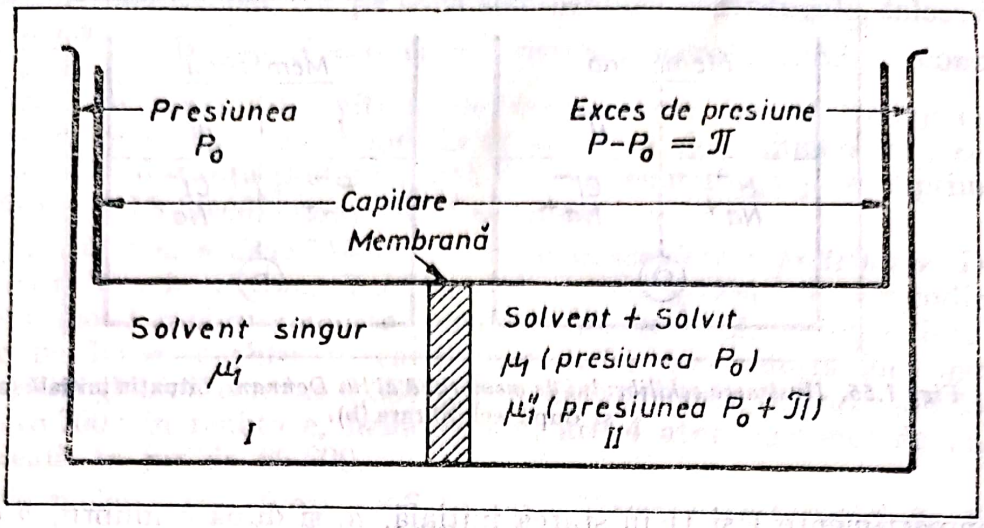


Fig. 1.56. Reprezentarea schematică a unui osmometru

sus și exprimînd în funcție de concentrația molară în săruri (m_3) se obține expresia : $\frac{\pi}{RTc} = \frac{1}{M} + \frac{Z^2c}{4Mm_3}$ din care se observă că la concentrația finală, efectul Donnan crește presiunea osmotică măsurată ; că creșterea concentrației în săruri scade această influență și că valoarea obținută prin extrapolare la diluție infinită nu este afectată prin efectul Donnan.

Aparatura utilizată pentru determinarea greutății moleculare cu această metodă este similară osmometrului (fig. 1.56).

1.3.3.6.3. PROPRIETĂȚILE IMUNOLOGICE ALE PROTEINELOR

Proteinele unei specii animale injectate unui animal de altă specie provoacă apariția unor substanțe care au capacitatea de a reacționa cu proteinele împotriva cărora s-au format. Proteinele injectate se numesc *antigeni* și substanțele formate ca răspuns la acestea, *anticorpi* ; antigenul reacționează cu anticorpul corespunzător formînd complecși *antigen-anticorpi (evidențiați și in vitro)*. Avînd în vedere importanța deosebită a acestei probleme, *ea va fi tratată într-un capitol special* (volumul II).

1.3.4. STRUCTURA PROTEINELOR

Complexitatea moleculară a proteinelor implică organizarea lor la nivele diferite : *structura primară, secundară, terțiară* și *cuaternară*. Caracterizarea nivelului de organizare, pe baza interacțiunilor necesare realizării și obținerii acestora, deși s-au ridicat unele obiecțiuni, este utilă pentru înțelegerea conformației, a proprietăților fizico-chimice și biologice ale proteinelor.

În principiu, *structura primară* se referă la legăturile covalente dintre aminoacizi, similare legăturilor uzuale ale compușilor organici, caracteristice moleculelor relativ mici (peptide). Cu creșterea numărului de aminoacizi și respectiv a moleculei, apar noi tipuri de legături și cele existente primesc atribute noi ; de exemplu, legăturile de H care determină *structura secundară* și impun anumite

conformaţii: *„helix"*, *„foaie pliantă"*. În cadrul segmentelor helicale, apar noi tipuri de legături între grupările laterale: *van der Waals*, saline etc., care determină *structura terţiară*. Interacţiunile între moleculele proteinelor, cu formarea de agregate aranjate caracteristic în spaţiu, datorită unor relaţii complexe de suprafaţă a resturilor de aminoacizi şi a unor porţiuni din legătura peptidică a monomerilor peptidici sau a subunităţilor proteinelor, conduce la *structura cuaternară*. Proprietăţile fizico-chimice şi biologice caracteristice sînt condiţionate de anumite nivele de organizare şi de aceea alterarea lor are drept consecinţă pierderea acestor proprietăţi, de exemplu, activitatea enzimatică, antigenică, hormonală etc.

1.3.4.1. *STRUCTURA PRIMARĂ. LEGĂTURA PEPTIDICĂ*

Toate peptidele şi proteinele au ca structură fundamentală o „coloană vertebrală" alcătuită dintr-un număr oarecare de aminoacizi, uniţi între ei prin *legătura peptidică*: —CO—NH— formată între gruparea α—NH_2 a unui aminoacid şi α—COOH a celui învecinat *(E. Fischer, 1901; Hofmeister, 1902)*. Toţi aminoacizii (cu excepţia Pro şi HiPro), indiferent de structura lor, participă în formarea lanţului peptidic prin acelaşi *fragment comun*: —CO—CH—NH— *(figura 1.57)*. Partea din aminoacizi care nu aparţine acestui fragment apare sub forma unui

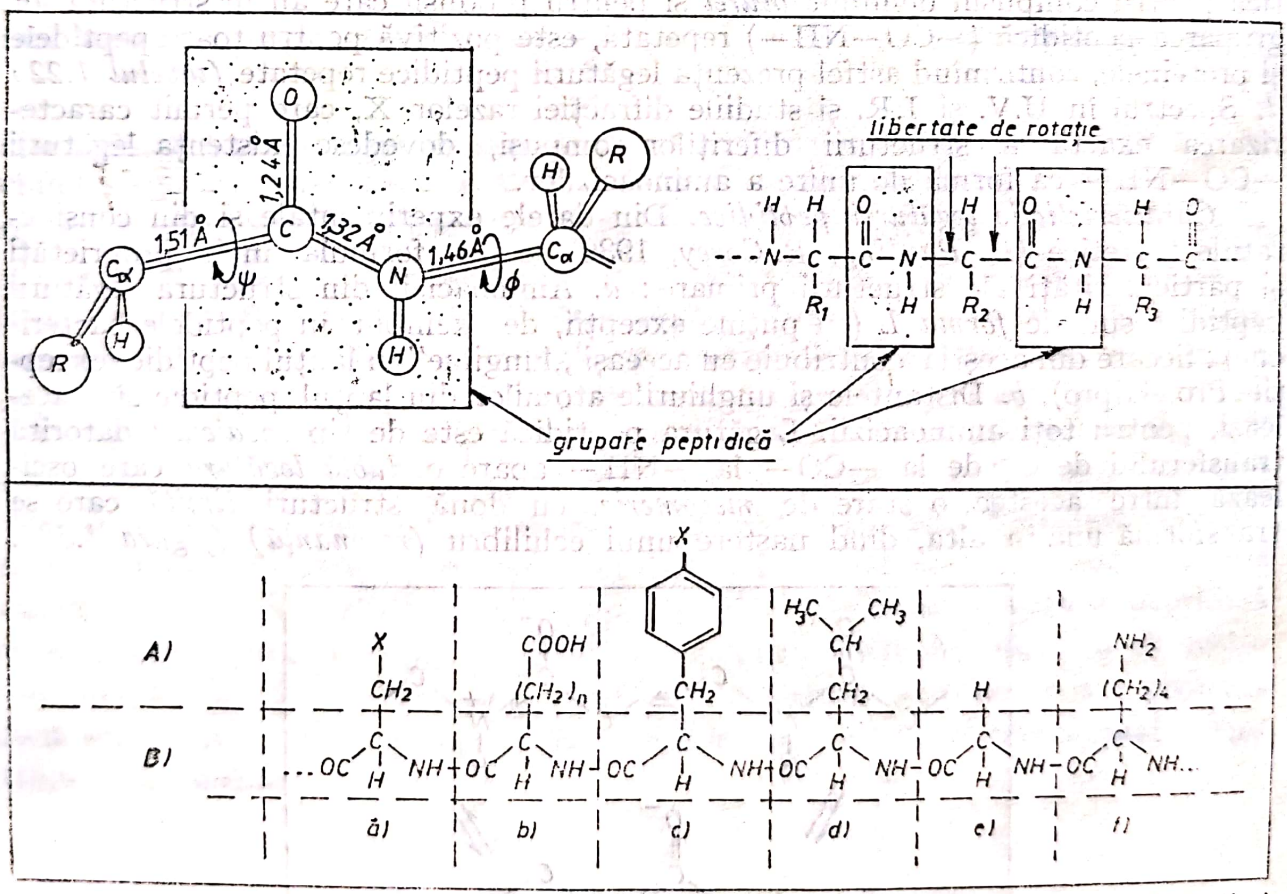


Fig. 1.57. Ilustrarea grupării peptidice (sus) şi încatenarea aminoacizilor în legătura peptidică (jos). a) X = H: alanina; X = OH: serina; X = SH: cisteina b) n = 1: acid aspartic; n = 2: acid glutamic c) X = H: fenilalanina; X = OH: tirozina d) valina e) glicocol (glicina) f) lizina B) *Partea identică*, indiferent de natura aminoacizilor A) *Partea variabilă*, dependentă de natura aminoacizilor

rest, care păstrează, în general, individualitatea și proprietățile caracteristice ale lanțului de hidrocarbură și a eventualelor funcțiuni pe care le posedă, de exemplu, gruparea —COOH în cazul diacizilor ; —NH_2 în diaminoacizi ;—OH alcoolic (Ser, Tre) sau fenolic (Tir) ; -SH în aminoacizii cu sulf ; resturile alifatice, aromatice, imidazol, indol etc.

Caracteristicile și diferențele la acest nivel sînt imprimate de numărul de aminoacizi, secvența (ordinea) acestora și de natura resturilor de aminoacizi. Secvența „la întîmplare" a aminoacizilor sau afectarea ordinii naturale duce la pierderea proprietăților, deoarece *secvența aminoacizilor specifică o anumită conformație.*

Argumente pentru existența legăturii peptidice : a. Peptidele și proteinele au un număr oarecare de grupări titrabile reprezentate prin grupările —COOH și —NH_2 de la capetele lanțului sau a celor neimplicate în legătura peptidică precum și a altor cauze care conferă un caracter acid sau bazic resturilor de aminoacizi. După neutralizarea acestora, prin hidroliza peptidei (proteinei) apar rapid un număr egal de grupări —COOH și —NH_2 titrabile, care pledează pentru unirea lor în molecula nativă, sub forma legăturii peptidice : —CO—HN— $\xrightarrow{H_2O}$ —COOH + H_2N—. *b.* Hidroliza parțială a peptidelor sau proteinelor duce la apariția unor di-, tri- și oligopeptide ; acțiunea enzimelor specifice este identică în cazul peptidelor naturale și de sinteză. *c.* Reacția „biuretului" caracteristică pentru compusul denumit *biuret* și pentru produșii care au în structura lor gruparea peptidică (—CO—NH—) repetată, este pozitivă pentru toate peptidele și proteinele, confirmînd astfel prezența legăturii peptidice repetate *(tabelul 1.22)* *d.* Spectrul în U.V. și I.R. și studiile difracției razelor X, care permit caracterizarea exactă a structurii diferiților compuși, dovedesc existența legăturii —CO—NH— ca formă de unire a aminoacizilor.

Caracteristicile legăturii peptidice. Din datele experimentale și din considerațiile teoretice (*L. Pauling, R. Corey*, 1930) se pot formula unele proprietăți și particularități ale structurii primare : *a.* Aminoacizii din structura legăturii peptidice sînt de *forma L* (cu puține excepții, de exemplu, în peptidele bacteriene) ; fiecare din aceștia contribuie cu aceeași „lungime" în lanțul peptidic (excepție Pro, Hipro). *b.* Distanțele și unghiurile atomilor din lanțul peptidic sînt aceleași, pentru toți aminoacizii. Legătura peptidică este de tip *covalent ;* datorită transferului de e^- de la —CO— la —NH— apare o *dublă legătură* care oscilează între acestea, o stare de *mezomerie*, cu două structuri *limită*, care se transformă una în alta, dînd naștere unui echilibru *(rezonanță) (figura 1.58).*

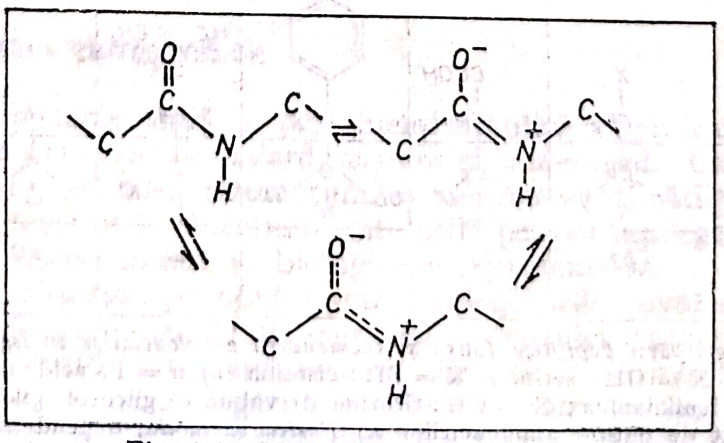


Fig. 1.58. Mezomeria legăturii peptidice

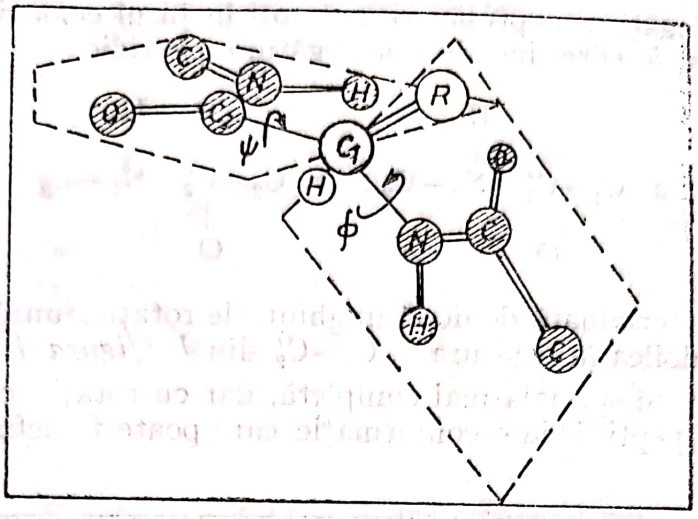
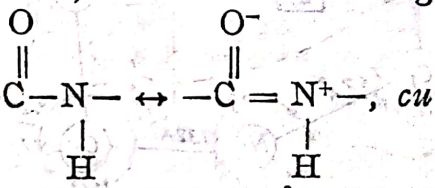
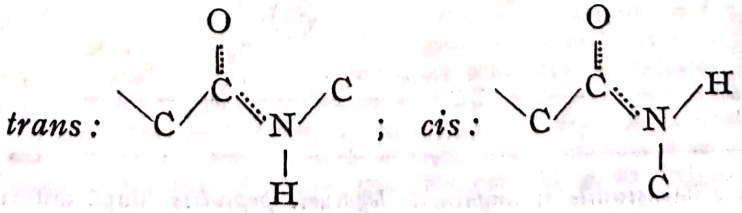


Fig. 1.59. Unghiurile de rotire în jurul legăturii C—C și C—N (după G. Paoletti).

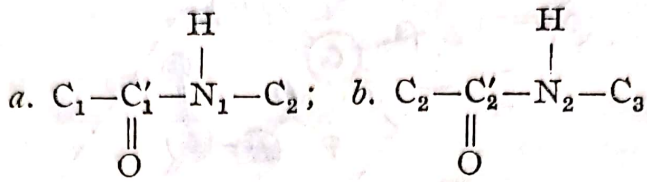
Din motivele arătate, nu există o libertate de rotație în jurul legăturii între C carbonilului și N grupării peptidice, deoarece această legătură are caracterul unei legături *„parțial duble"*:



cu lungimea de 1,32 Å, intermediară față de legătura simplă C—N (1,49 Å) și dublă C=N (1,27 Å). În schimb, legătura între α—C și C din carbonil și legătura între α—C și N sînt *legături simple pure*. În consecință, apare un mare grad de libertate rotatorie în jurul acestor legături, de ambele părți ale unității peptidice rigide. Rotația în jurul acestor legături este definită prin unghiurile ψ și Φ; conformația lanțului principial al polipeptidelor este astfel pe deplin caracterizată cînd se cunosc unghiurile respective pentru fiecare din aminoacizii componenți *(figura 1.59)*. *c.* Cei șase atomi, participanți în legătura peptidică și respectiv doi atomi de C adiacenți: $C_\alpha—CO—HN—C_\alpha$ reprezintă *o unitate rigidă în același plan*. Această coplanaritate a fost dovedită experimental și corespunde considerațiilor teoretice cu privire la mezomerie și la faptul că fiind favorizată energetic este cea mai stabilă. *d. Carbonii adiacenți alfa se găsesc în poziție trans*. Legătura peptidică nu este prea puternică ($\Delta_G = -7$ kcal/mol) și este cu atît mai slabă cu cît resturile laterale ale aminoacizilor sînt mai lungi. Legătura peptidică poate prezenta două conformații: *cis* și *trans*, dar în peptidele naturale se găsește numai forma trans, mai stabilă:



Atomii adiacenți legăturii peptidice se pot roti în jurul celor două legături simple, notate cu *a* și *b* care incadrează legătura peptidică:



Conformația este determinată de două unghiuri de rotație, unul în jurul legăturii $N_1—C_1$ din *a* și al doilea în legătura $—C_2—C_2'$ din *b* *(figura 1.60 A.)*

Într-o reprezentare spațială mai completă, dar cu rotația celor două legături identică, lanțul polipeptidic ia o conformație care poate fi definită prin valoarea

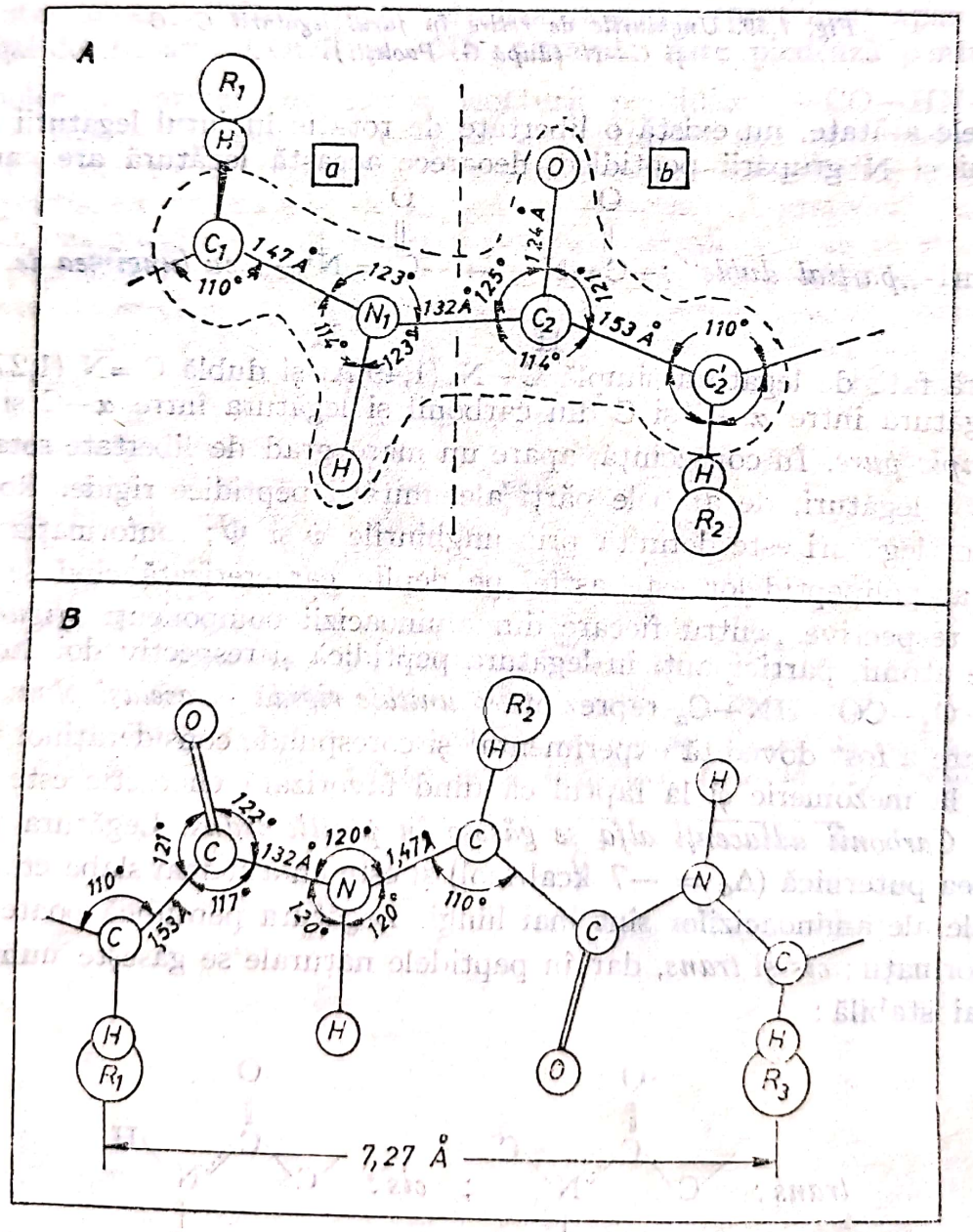


Fig. 1.60. Dimensiunile și unghiurile legăturii peptidice (după autori diferiți)

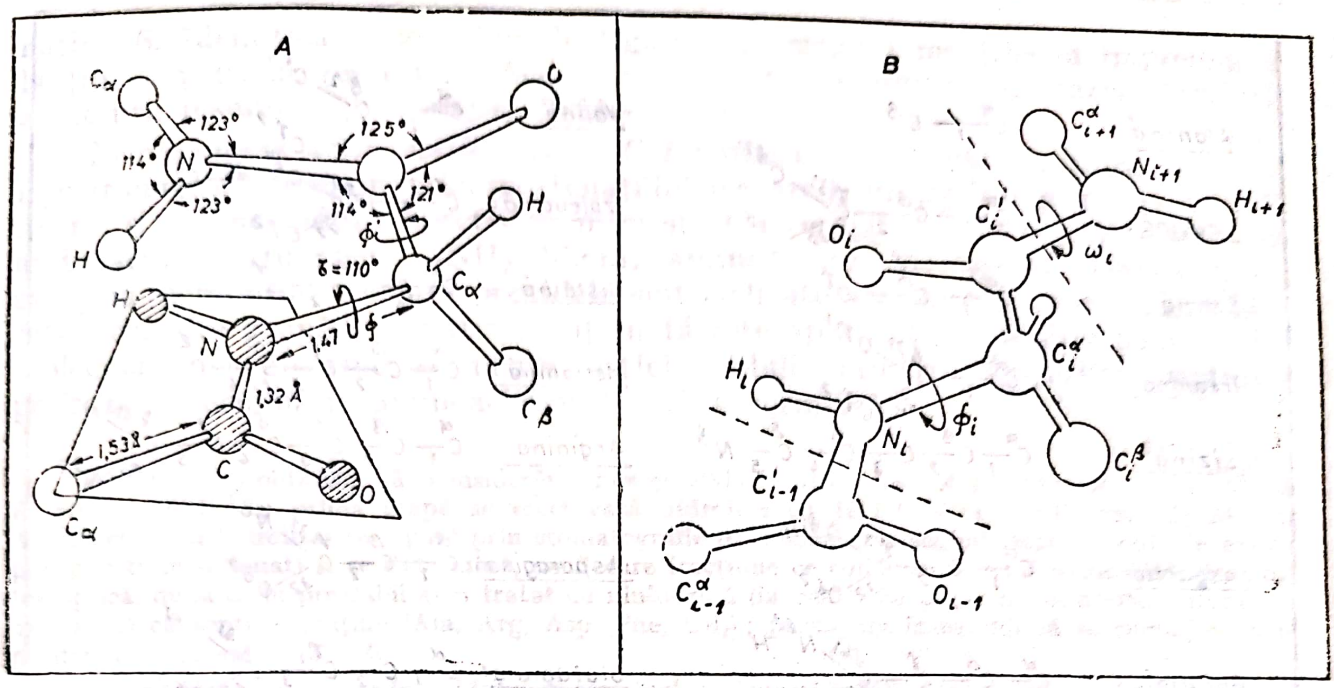


Fig. 1.61. A. *Tipuri de legături din lanțul polipeptidic cu dimensiunile distanțelor și unghiurilor (conformație standard:* $\Phi = \Phi' = 0$). B. *Reprezentarea spațială a unei secțiuni din legătura peptică* (liniile întrerupte arată limitele resturilor de aminoacizi).

unghiurilor Φ și Φ_1, *(figura 1.61* A*)*. Cînd două legături peptidice învecinate se găsesc în același plan cu atomul de C dintre ele atunci $\Phi = \Phi_1 = 0$.

Datorită distribuției electronilor în jurul atomilor participanți în legătura peptidică, O din gruparea —CO— are un exces de electroni și gruparea —NH— un deficit și apare o tendință mai puternică de a forma legături de H. Stabilitatea maximă a unui lanț peptidic este atinsă atunci cînd fiecare grupare —CO— formează o legătură de H cu o grupare —NH—. Dacă se mențin aceleași unghiuri pentru fiecare punct de legătură peptidică, structura va fi α-helix (a se vedea în continuare). Prezența lanțurilor laterale impune restricții în rotație *(Ramachandran)*.

1.3.4.1.1. CONVENȚII DE REPREZENTARE ȘI NOMENCLATURĂ

Considerînd reprezentările și nomenclaturile variate utilizate pentru exprimarea conformațiilor peptidice s-a propus (1966) formularea din *figura 1.61.B*, în care sînt reprezentați trei aminoacizi: cel din mijloc se notează cu indicele i, ceilalți cu $i - 1$, respectiv $i + 1$. Rotația în jurul legăturii N—C^α se notează cu Φ; rotația în jurul C^α—C′ cu ψ și, dacă este necesar, în jurul C′—N cu, ω. Numerotarea secvențială a atomilor sau legăturilor se poate preciza prin indici, de exemplu Φ_i, ψ_i, ω_i, C_i, N_i etc., cu mențiunea că prin această notare se înțelege că legăturile Φ_1 și ψ_1 sînt localizate în restul aminoacidului i, în timp ce ω_i leagă restul i cu $i + 1$. În privința sensului de rotație, unghiurile se consideră pozitive, cînd rotația este spre dreapta. Conformația reprezentativă pentru lanțul polipeptidic complet întins se caracterizează prin unghiurile $\Phi_i = \psi_1 = \omega_1 = 0$, ceea ce denotă că legătura C^α—C′ este în *cis* față de —NH—, în raport cu rotația în jurul —N—C^α; (Φ) și conformația *trans* la legătura peptidică, adică legătura C′—O *trans* față de legătura N—H (ω).

În cazul precizării lanțurilor laterale, se notează scheletul de carboni începînd cu C alăturat carboxilului implicat în legătura peptidică, notat cu α, următorul cu β etc.; cînd apare o ramificație, pe lîngă litera din alfabetul grec se folosesc indici numerici scriși sus la dreapta literei. Legăturile dintre atomi se notează cu cifre arabe, 1, 2, 3 și unde apar ramificații se alătură o a doua cifră, de exemplu, ramificarea la legătura 4 se va specifica prin 41 și 42 *(figura 1.62)*.

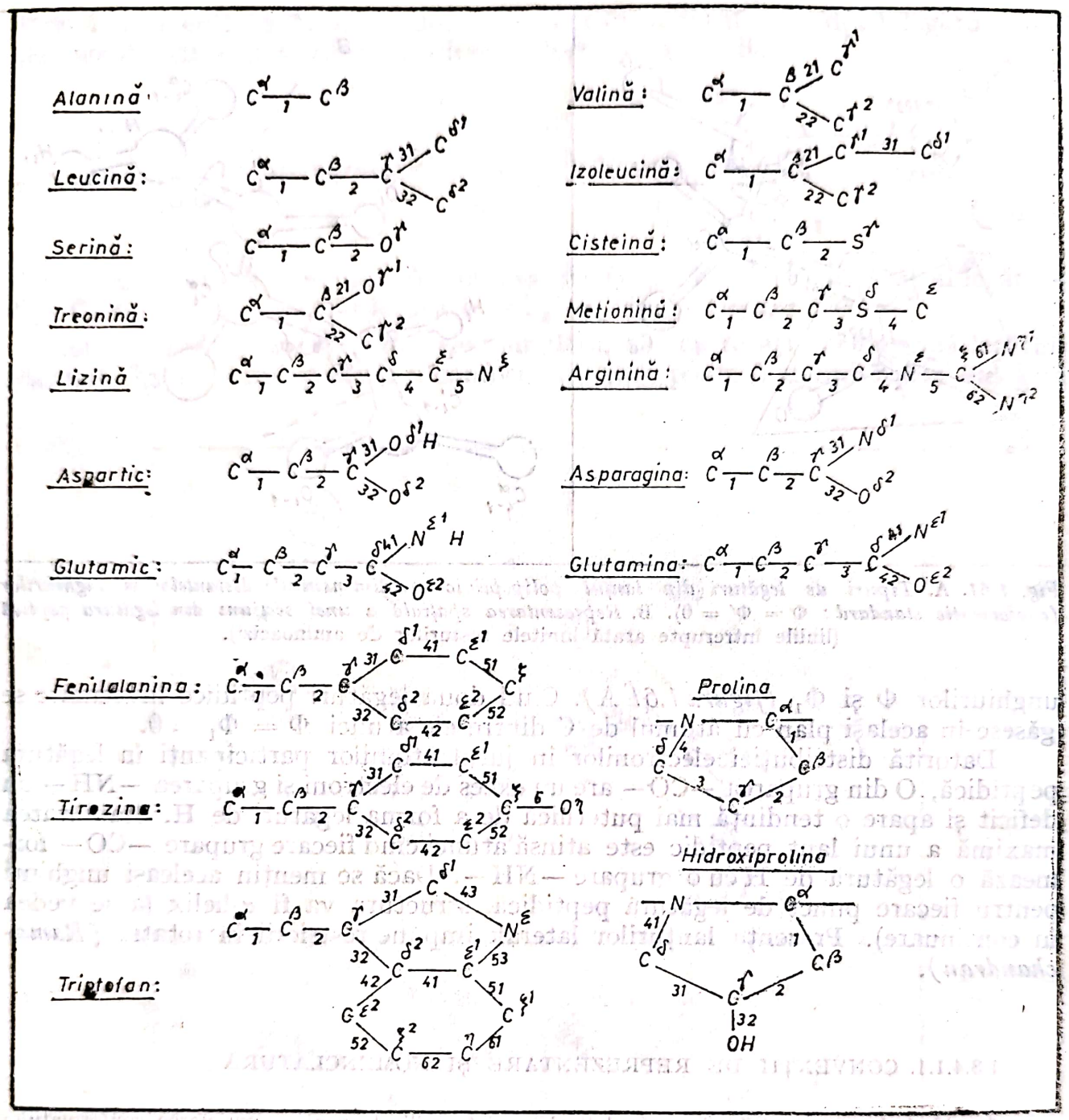


Fig. 1.62. Numerotarea atomilor şi legăturilor în aminoacizi

1.3.4.1.2. DETERMINAREA STRUCTURII PRIMARE A PROTEINELOR

Elucidarea structurii primare a proteinelor este un proces complex care comportă mai multe etape şi operaţii: 1. Determinarea numărului de lanţuri independente de polipeptide din molecula proteinei; 2. Clivarea legăturilor interpeptidice şi separarea lanţurilor individuale; 3. Desfacerea din molecula nativă a lanţurilor polipeptidice şi separarea acestora, specific, în fragmente mai mici; 4. Determinarea conţinutului şi secvenţei fiecărui produs de clivare, 5. Potrivirea segmentelor individuale într-o secvenţă unică pentru fiecare lanţ

nativ; 6. Identificarea locurilor de legare care asigură menţinerea împreună a lanţurilor peptidice esenţiale. Aceste etape au fost enunţate cu ocazia elucidării structurii insulinei *(F. Sanger, 1952—1955)*.

Determinarea aminoacizilor N şi C terminali. O peptidă alcătuită dintr-un număr oarecare de aminoacizi încatenaţi între ei are la un capăt o grupare —COOH liberă şi aminoacidul respectiv se numeşte *C-terminal*, iar la celălalt capăt un aminoacid cu gruparea $-NH_2$ liberă, aminoacidul *N-terminal*. Deoarece, cu excepţia compuşilor în care peptidele sînt ciclizate sau în care capetele sînt blocate prin alte grupări, situaţia menţionată este aplicabilă şi fiecărei peptide din molecula unei proteine se poate astfel stabili numărul lanţurilor peptidice pe baza determinării aminoacizilor N- şi C-terminali.

Pentru exemplificare să considerăm hexapeptida: *Ala—Gli—Asp—Phe—Arg—Gli* (după *L. Stryer, 1975*). În prima etapă se efectuează hidroliza cu HCl 6 N la 110°C, timp de 24 ore. Aminoacizii din hidrolizat se separă prin cromatografie pe coloană cu schimbători de ioni (de exemplu, polistiren-sulfonat) şi se determină, pe fiecare fracţiune ce corespunde unui aminoacid, densitatea optică, după ce în prealabil s-au tratat cu ninhidrină (la cald). Se obţin astfel primele informaţii care arată că peptida conţine (Ala, Arg, Asp, Phe, Gli_2); paranteza înseamnă că se cunoaşte compoziţia, dar nu secvenţa.

Pentru identificarea aminoacidului N-terminal se „marchează" acesta cu un compus cu care formează legături covalente, de exemplu, *fluordinitrobenzen* (FDNB), fenilizotiocianat (PITC) sau cu clorura de dansil *(figura 1.63)*.

FDNB (în metoda *Sanger*) reacţionează cu gruparea $\alpha—NH_2$ liberă şi formează un derivat dinitrofenil (DNP) al peptidei (de culoare galbenă); cu o legătură formată cu aminoacidul ce rezistă la hidroliza cu HCl 6 N, care desface aminoacizii din polipeptide şi astfel apare DNP-aminoacidul terminal, în cazul de faţă DNP—Ala, care se identifică cromatografic *(figura 1.63)*. În mod similar, clorura de dansil dă derivaţi sulfonamidici fluorescenţi. Dezavantajul metodei este că permite numai determinarea primului aminoacid şi nu se poate repeta. Pentru a evita acest neajuns se foloseşte *degradarea secvenţială a lui Edman*, cu fenilizotiocianat (PITC) ce formează cu gruparea $\alpha—NH_2$ liberă un derivat feniltiocarbamil, care se eliberează în mediu slab acid sub forma unui derivat ciclic, feniltiohidantoin-aminoacid, în cazul de faţă PTH—Ala. Pe peptida rămasă, cu un aminoacid în minus faţă de cea iniţială, se aplică, repetat, acelaşi procedeu. PTH-aminoacizii obţinuţi, în fie-

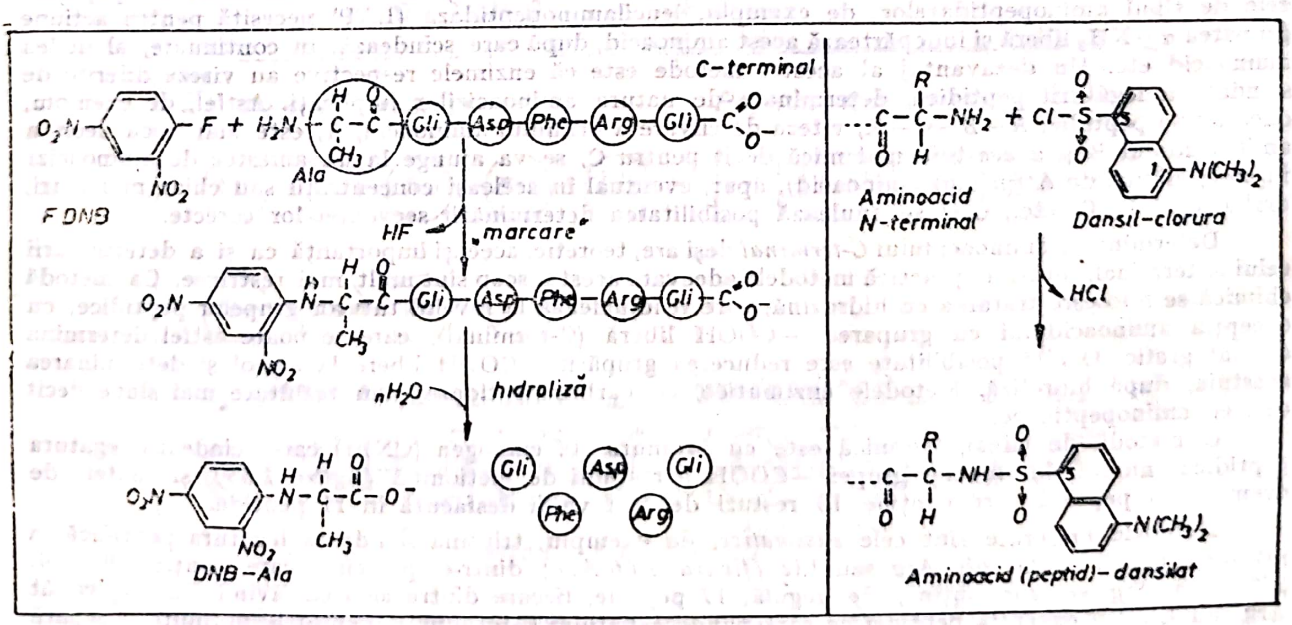


Fig. 1.63. Determinarea aminoacizilor N-terminali cu FDNB (fluordinitrobenzen, *reactivul Sanger*) ***şi cu clorura de dansil*** (1-dimetilaminonaftalen-5-clorsulfonil).

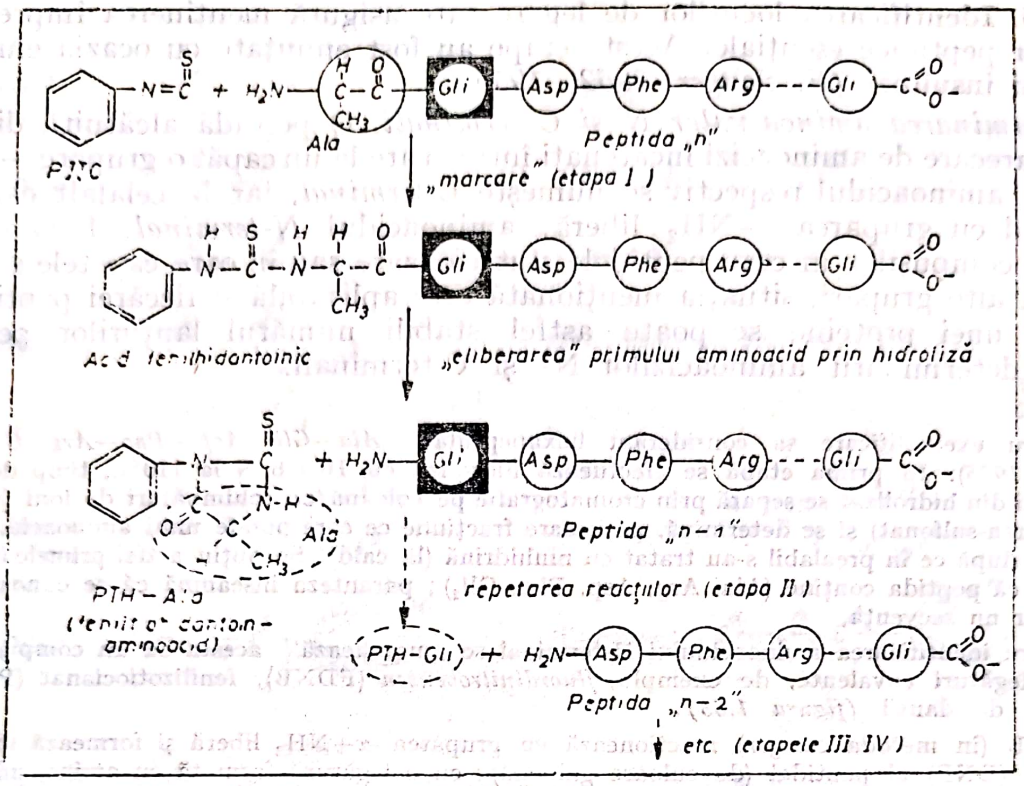


Fig. 1.64. Degradarea Edman prin fenilizotiocianat (PITC), cu eliberarea succesivă a fenil-tiohidantoin-aminoacizilor (PTH-aminoacizi).

care etapă, se identifică cromatografic, obținîndu-se astfel secvența (ordinea) tuturor aminoacizilor componenți, *(figura 1.64)*.

În mod similar, cianatul de potasiu (NCO^-K^+) în soluție slab alcalină dă peptide carbamilate din care, în mediu de acizi diluați la temperatură ridicată, se eliberează aminoacidul N-terminal sub formă de derivat de hidantoină.

Pentru stabilirea aminoacidului N-terminal pot fi utilizate și metode *enzimatice*. Exopeptidazele de tipul aminopeptidazelor, de exemplu, leucilaminopeptidaza (LAP) necesită pentru acțiune gruparea $\alpha-NH_2$ liberă și îndepărtează acest aminoacid, după care scindează, în continuare, al doilea aminoacid etc. Un dezavantaj al acestei metode este că enzimele respective au viteze diferite de scindare a legăturii peptidice, determinate de natura aminoacizilor implicați. Astfel, de exemplu, dacă într-o peptidă: A—B—C—R, viteza de clivare a primului aminoacid, A, este mai mică decît a aminoacidului B și a acestuia mai mică decît pentru C, se va ajunge la un amestec de aminoacizi în care, alături de A (primul aminoacid), apar, eventual în aceleași concentrații sau chiar mai mari, aminoacizii B, C, etc., deci se anulează posibilitatea determinării secvenței lor corecte.

Determinarea aminoacidului *C-terminal* deși are, teoretic, aceeași importanță ca și a determinării celui N-terminal, totuși, în practică metodele adecvate acestui scop sînt mult mai restrînse. Ca metodă chimică se folosește tratarea cu hidrazină, care reacționează la nivelul tuturor grupelor peptidice, cu excepția aminoacidului cu gruparea —COOH liberă (C-terminal), care se poate astfel determina cromatografic. O altă posibilitate este reducerea grupării —COOH libere la alcool și determinarea acestuia, după hidroliză. Metodele enzimatice, cu carboxipeptidaze, dau rezultate mai slabe decît cele cu aminopeptidaze.

O metodă de clivare chimică este cu bromura de cianogen (CNBr) care scindează legătura peptidică numai la nivelul grupei —COOH a restului de metionină *(figura 1.65)* și astfel, de exemplu, o peptidă care conține 10 resturi de Met va fi desfăcută în 11 peptide.

Metodele preferate sînt cele *enzimatice*, de exemplu, tripsina scindează legătura peptidică la nivelul grupării —CO—din Arg sau Liz *(figura 1.66.A.)*; dintr-o proteină care conține 9 mol. Liz și 8 Arg se vor obține, de regulă, 17 peptide, fiecare dintre acestea avînd la un capăt Arg sau Liz (cu excepția peptidei ce corespunde capătului C-terminal). Peptidele obținute se separă cromatografic și pe fiecare se determină secvența aminoacizilor; pentru a determina ordinea acestora în proteina inițială sînt necesare informații suplimentare pentru obținerea cărora se recurge

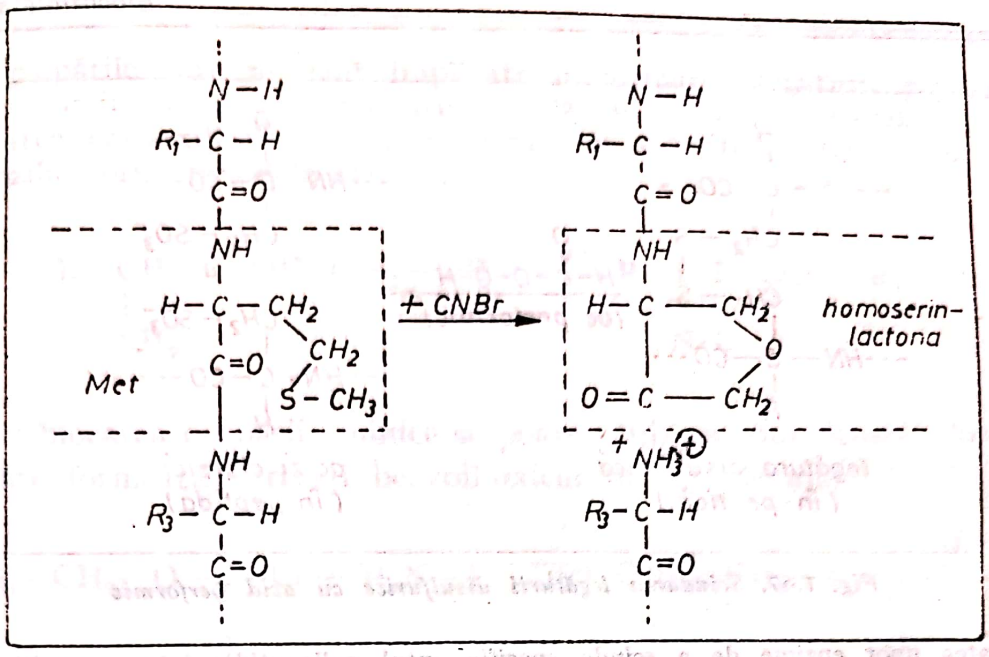


Fig. 1.65. Scindarea legăturii peptidice la nivelul grupării carboxil a metioninei, prin bromura de cianogen.

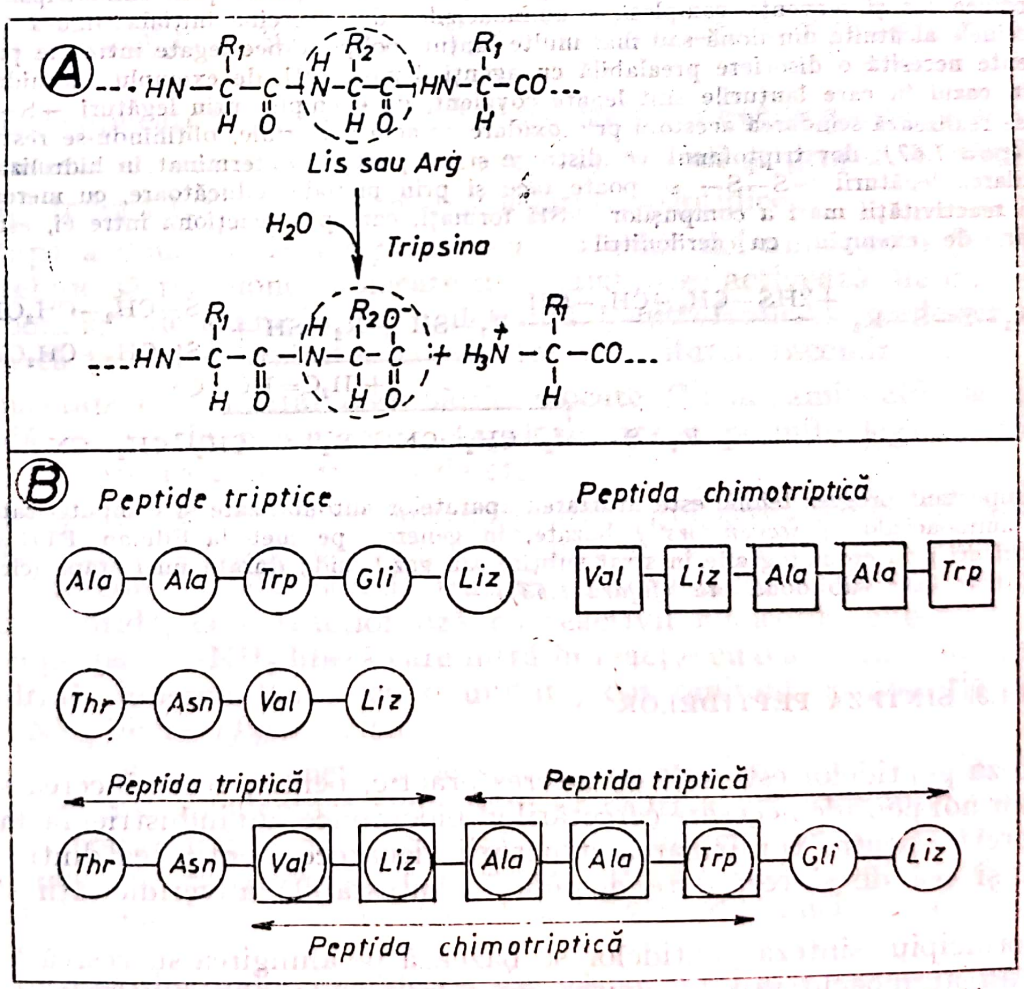


Fig. 1.66. Scindarea unei peptide prin tripsină (A); peptide triptice și chimotriptice (B). Peptida obținută prin acțiunea chimotripsinei „acoperă" două peptide triptice și permite astfel stabilirea secvenței lor.

Scanned with OKEN Scanner

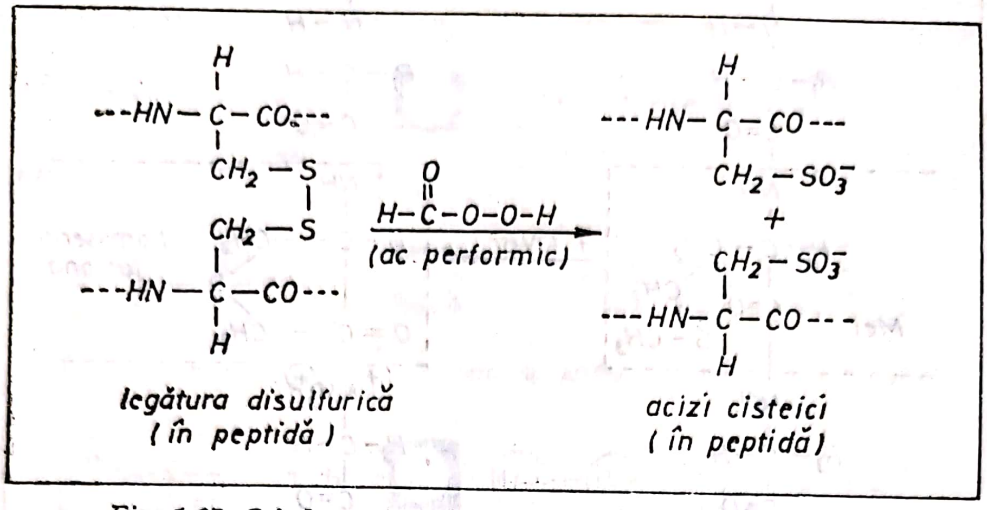


Fig. 1.67. Scindarea legăturii disulfurice cu acid performic

la proprietatea unor enzime de a scinda specific lanțul polipeptidic între anumiți aminoacizi, de exemplu, chimotripsina rupe preferențial legătura dintre gruparea —COOH a unui aminoacid aromatic cu gruparea $-NH_2$ a altui aminoacid mare cu grupări nonpolare. Prin „suprapunerea" („overlap peptides") secvențelor obținute cu tripsina peste cele obținute prin chimotripsină se poate deduce ordinea lor și secvența completă a aminoacizilor din proteina inițială (figura 1.66 B).

Proteinele alcătuite din două sau mai multe lanțuri polipeptidice legate între ele prin legături noncovalente necesită o disociere prealabilă cu agenți denaturanți, de exemplu, clorhidrat de guanidină; în cazul în care lanțurile sînt legate covalent, de exemplu, prin legături —S—S—, ca în insulină, se realizează scindarea acestora prin oxidare cu acid performic, obținîndu-se resturi de acid cisteic *(figura 1.67)*, dar triptofanul se distruge și nu poate fi determinat în hidrolizat.

Scindarea legăturii —S—S— se poate face și prin metode reducătoare, cu mercaptoetanol. Din cauza reactivității mari a compușilor —SH formați, care pot reacționa între ei, este necesară fixarea lor, de exemplu, cu acrilonitril:

$$R_1-S-S-R_2 \xrightarrow{+2HS-CH_2-CH_2-OH} R_1-SH + R_2-SH + \begin{cases} S-CH_2-CH_2OH \\ S-CH_2-CH_2OH \end{cases}$$

$$\downarrow + H_2C=HC-CN$$

$$R_1-S-CH_2-CH_2-CN + R_2-S-CH_2-CH_2-CN$$

Un important progres tehnic este utilizarea aparatelor automatizate și computerizate de determinare a aminoacizilor *(„sequenators")* bazate, în general, pe metoda Edman, PTH-aminoacizii fiind identificați prin cromatografie în strat subțire sau gaz-lichid; durata unei etape (ciclu) de degradare Edman este sub două ore *(figura 1.53)*.

1.3.4.1.3. SINTEZA PEPTIDELOR

Sinteza peptidelor este atît de interes practic, pentru reproducerea sau obținerea unor noi peptide necesare cercetărilor biochimice sau industriei farmaceutice cît și teoretic, pentru confirmarea structurii, deoarece identitatea dintre peptida naturală și cea de sinteză este dovada incontestabilă a veridicității structurii propuse.

În principiu, sinteza peptidelor se bazează pe alungirea succesivă a lanțului cu cîte un aminoacid sau pe unirea unor fragmente oligopeptidice. Grupările —COOH și $-NH_2$ libere din aminoacizi nu reacționează, în mod obișnuit, între ele, de aceea este necesar ca una dintre ele să fie activată și în același timp să se

blocheze grupările care nu sînt implicate în formarea legăturii peptidice (de obicei este suficientă blocarea grupărilor de la un singur aminoacid).

Gruparea carboxilică poate fi blocată prin esterificare (cu alcool metilic, etilic, benzilic) prin metodele clasice:

$$R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COOH + R_1-OH \xrightarrow{-H_2O} R-\underset{\displaystyle NH_2}{\underset{|}{CH}}-COO-R_1$$

Pentru blocarea grupării aminice se poate utiliza acidul benzoil-cloro-carbonic, cu care formează derivaţi benzoil-oxicarbonilici, denumiţi *CBZ* sau *Z:*

$$C_6H_5-CH_2-O-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-Cl + H_2N-R \xrightarrow{-HCl} C_6H_5-CH_2-O-\overset{\displaystyle O}{\overset{\|}{C}}-\overset{\displaystyle H}{N}-R$$

sau anhidrida trifluor-acetică, formîndu-se derivaţi trifluoracetici:

$$(F_3C-CO)_2O + R-NH_2 \rightarrow F_3C-CO-NH-R + F_3C-COOH$$

Metodele aplicate în această primă etapă trebuie alese în aşa fel încît să nu se producă racemizări sau să conducă la compuşi stabili şi gruparea introdusă să fie uşor de îndepărtat, după formarea legăturii peptidice.

În etapa a doua, *de legare propriu-zisă* a celor doi aminoacizi (cu funcţiile care nu trebuie să reacţioneze blocate în prealabil) se activează, de obicei, gruparea carboxilică, de exemplu, ca acilclorură, p-nitrofenilester, tiolester etc., cu menţiunea că şi aici dificultatea constă tot în evitarea racemizării.

Ultima etapă este eliberarea grupărilor blocate. Din doi aminoacizi se ajunge la o dipeptidă, care prin parcurgerea etapelor descrise permite legarea unui nou aminoacid cu formarea unei tripeptide etc.

Un caz particular, de interes special pentru înţelegerea structurii proteinelor este sinteza unor polipeptide alcătuite dintr-un singur fel de aminoacizi. În acest caz este convenabilă metoda tratării aminoacizilor cu fosgen, cînd apare N-carboxianhidrida, care reacţionează cu reactivii nucleofili, eliberează CO_2 şi formează o grupare $-NH_2$ liberă care intră în reacţie cu o altă moleculă de N-carboxi-anhidridă, lungind lanţul cu o unitate, concomitent cu apariţia unei noi grupări $-NH_2$ libere *(figura 1.68)*.

Recent s-a elaborat o metodă de sinteză a peptidelor mai simplă, în stare solidă, prin fixarea covalentă a funcţiunii —COOH a aminoacidului C-terminal pe o rezină; tratarea în continuare cu un aminoacid activat conduce la o dipeptidă blocată, capabilă să reacţioneze cu un nou aminoacid ş.a.m.d. *(Merrifield)*. Această metodă a rezolvat sinteza bradikininei (nonapeptidă) în timp de 8 zile.

Valorificarea diferitelor metode de sinteză, inclusiv a utilizării fragmentelor oligopeptidice, a fost încununată prin sinteza hormonului somatotrop cu 181 aminoacizi *(C. H. Li, 1971)*.

Scanned with OKEN Scanner

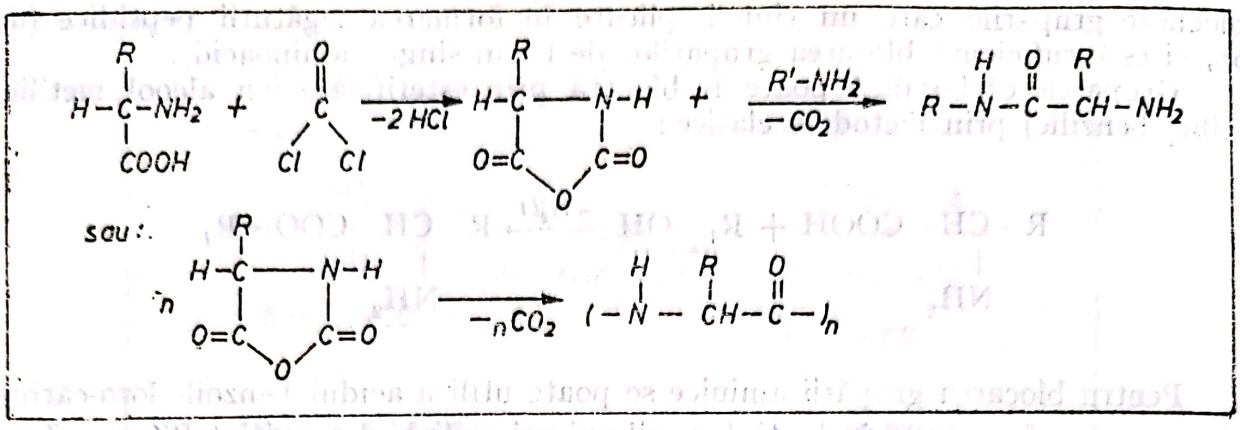


Fig. 1.68. Schema generală de sinteză a polipeptidelor

1.3.4.2. *STRUCTURA SECUNDARĂ A PROTEINELOR. STRUCTURI PERIODICE: α-HELIX, FOAIE PLIANTĂ β ŞI HELIX DE COLAGEN*

Structura secundară a proteinelor implică legăturile de H şi este o consecinţă a reactivităţii legăturii peptidice însăşi. Din această cauză ea este în mică măsură, sau chiar deloc influenţată de natura resturilor de aminoacizi neimplicaţi direct în legătura peptidică. Aprecierea particularităţilor acestor tipuri de legături conduce la concluzia că structurile cele mai posibile, datorită legăturilor de H intramoleculare, sînt structurile α-helix şi β-foi pliante; denumirile α şi β aparţin lui *Pauling* şi *Corey* şi indică descoperirea lor cronologică, prima fiind α şi a doua β.

Structura α-helix. În cadrul structurii helicale a polipeptidelor (proteinelor) cea mai stabilă este α-helixul, în formă de „bară" („tub", „rodlike"), în care lanţul principal: —C—CO—HN—C—, puternic înfăşurat, formează partea interioară, iar resturile laterale se orientează spre exterior, într-o arie helicală *(figura 1.69)*.

α-Helixul este stabilizat prin legături de H între grupările NH şi CO din legăturile peptidice principale, în aşa fel încît gruparea —CO— a fiecărui aminoacid este legată de gruparea —NH— a aminoacidului situat la o distanţă de patru resturi, în secvenţa liniară *(figura 1.69.c)*. În consecinţă, toate grupările —CO— şi —NH— din „coloana vertebrală" a polipeptidei sînt legate între ele prin legături de H. Fiecare rest de aminoacid se situează la o distanţă de 1,5 Å de-a lungul helixului, cu o rotaţie de 100°, ceea ce corespunde la 3,6 resturi de aminoacizi pe o spiră a cărei lungime este de 5,4 Å. Conform acestei arhitecturi spaţiale, aminoacizii care se găsesc între ei la o distanţă de 3—4 resturi apar strîns apropiaţi de α-helixul învecinat, putînd forma diferite legături de contact, în timp ce aminoacizii despărţiţi prin 1—2 resturi se găsesc de părţi opuse ale helixului şi nu oferă condiţiile de a intra în contact. Sensul de rotire al α-helixului poate fi spre stînga sau spre dreapta, dar numai cele din urmă se găsesc în structura proteinelor. Conţinutul structurii α-helix din proteine este foarte variabil, constituind motivul structural predominant în hemoglobină şi mioglobină, şi lipseşte din chimotripsină.

α—Helixul monolanţ, sub formă de „bastoane" scurte, sub 40 Å în lungime, este cel mai răspîndit, dar pot apare şi structuri mai lungi, de 1.000 Å şi chiar mai mari. De asemenea, mai multe α-helixuri se pot înfăşura formînd un „cor-

Scanned with OKEN Scanner

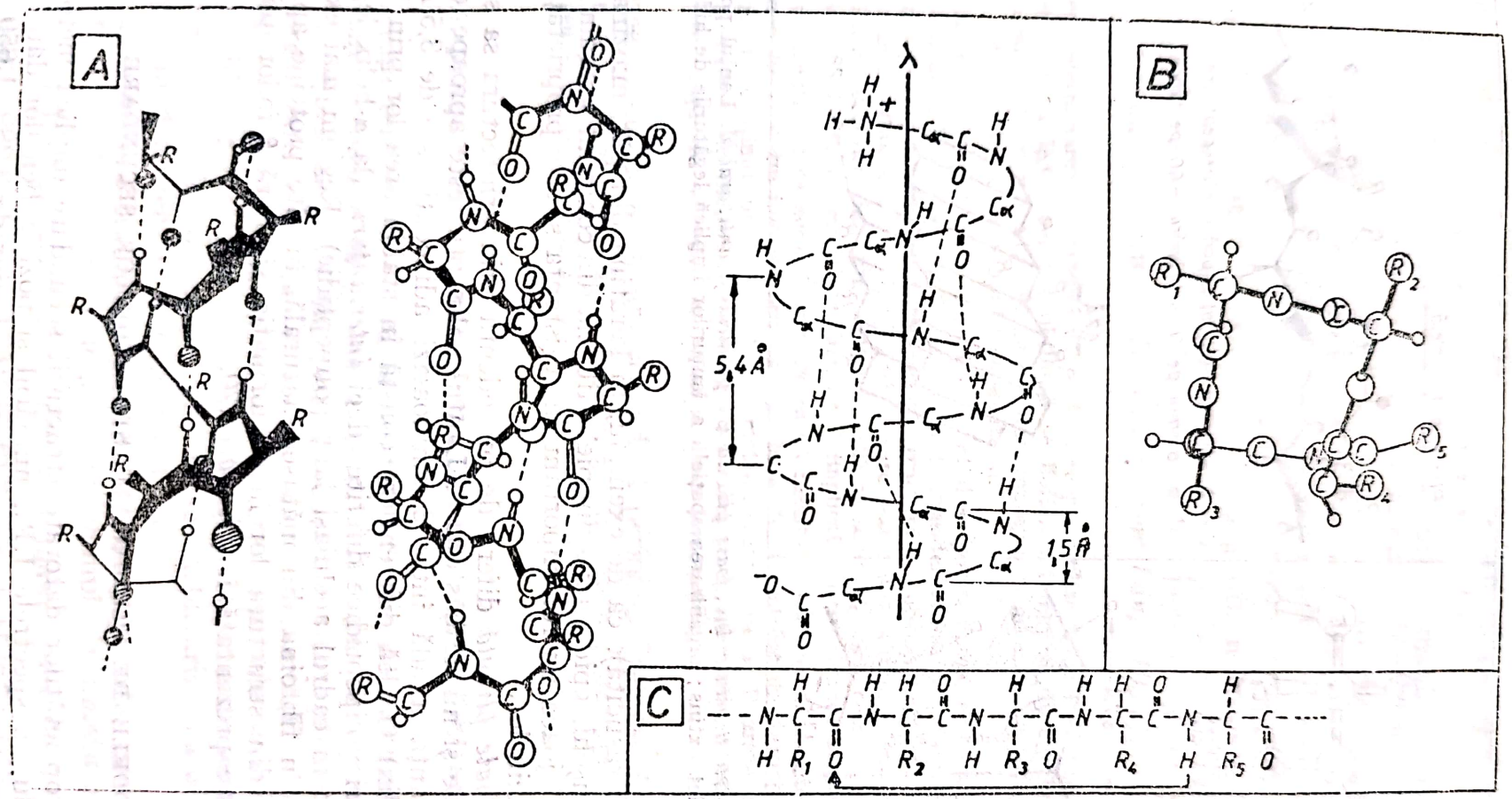


Fig. 1.69. Reprezentarea unui fragment de α-helix (după Stanley, Corey). A. vedere laterală, cu ilustrarea legăturilor; *B.* proecția pe un plan perpendicular pe axă (atomii sînt notați cu simboluri; H cu cerculeţe fără litere; liniile întrerupte: legături de H). *C.* În α-helix, gruparea —NH— a restului de aminoacid „n" se leagă prin legături de H cu gruparea —CO— a aminoacidului „n—4".

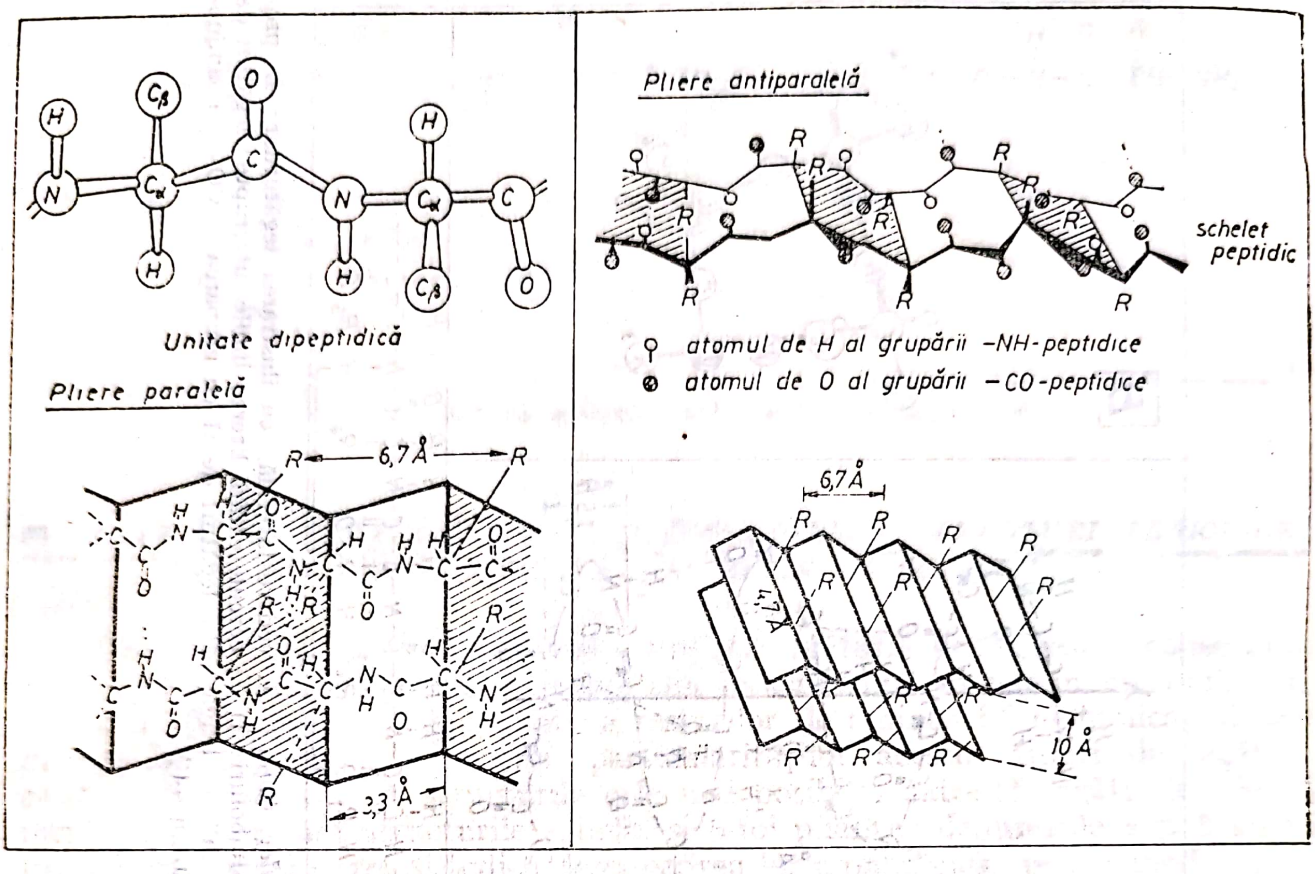


Fig. 1.70. Modele pentru structura în „foaie pliantă β" paralelă și antiparalelă. Lanțul polipeptidic este aproape complet extins; organizarea spațială a lanțurilor implică legăturile de hidrogen.

don" (ca o sfoară răsucită), ca de exemplu, în keratina din păr, miozina și tropomiozina din mușchi, epidermina din piele, fibrina din coagulul sanguin; aceste „fire" sau „fibre" joacă un rol important în rezistența și alte proprietăți fizico-mecanice ale proteinelor.

Structura β-foaie pliantă diferă de precedenta prin arhitectura sa spațială, sub formă de foaie și nu de bastonașe. Lanțul polipeptic este aproape complet extins, încît distanța axială între 2 aminoacizi adiacenți este de 3,5 Å (față de 1,5 Å în α-helix) O altă diferențiere constă în stabilizarea lor prin legături de H între lanțuri polipeptidice diferite, deci *interlanțuri* (la α-helix legăturile de H se stabilesc în cadrul aceluiași lanț polipeptidic). Regiuni mai extinse β s-au găsit numai în fibroina din mătasea naturală, în alte proteine apar doar segmente reduse din structura lor în conformația similară β-foilor pliante, a căror ilustrare este prezentată în *figura. 1.70.*

1.3.4.2.1. METODELE DE STUDIU ALE STRUCTURILOR SECUNDARE

Studierea proprietăților datorate structurii secundare implică metode specifice; de exemplu, în spectrele I.R., numărul și poziția benzilor dau indicații asupra acestei structuri, fiind de interes benzile în jur de 3.289, 1.650 și 1.535 cm^{-1}. Ultimele două se denumesc benzile „amidă I" și „amidă II" și prezintă modificări în timpul trecerii de la o formă „la întîmplare" la α-helix sau la cele

două tipuri de β-foaie pliantă: *paralele* (cu lanţurile paralele şi îndreptate în acelaşi sens, adică avînd capătul N-terminal de aceeaşi parte) şi *antiparalele* (cînd sînt îndreptate în sens invers) *(a se vedea şi 1.3.4.4)*.

Studiile cu I.R. polarizate arată o absorbţie maximă cînd vibraţiile sînt paralele cu vectorul electric al luminii şi absenţa absorbţiei cînd sînt perpendiculare. Acestea, împreună cu dispersia rotatorie, ca funcţie a lungimii de undă a luminii monocromatice, au permis obţinerea unor date asupra structurii secundare care ilustrează coexistenţa unor regiuni α-helix cu cele „la întîmplare" şi importanţa raportului dintre acestea pentru caracterizarea proteinelor.

O altă metodă utilă pentru aprecierea gradului de extindere a regiunilor α-helicale este metoda *schimbului de deuteriu*, pe baza observaţiei că protonii legaţi de atomii cu perechi neparticipante de electroni (C, O, N, S) se schimbă rapid cu protonii solventului (*K. Linderstrom-Lang, 1955*).

Pentru determinarea schimbului de protoni se pot utiliza tehnici diferite, de exemplu, echilibrarea protonilor cu D_2O; peptida obţinută se liofilizează apoi se dizolvă în apă obişnuită şi se determină apariţia D în solvent. Metoda are dezavantajul că necesită un timp prea lung pentru a permite ca toţi protonii să se schimbe cu deuteriu.

În cazul *insulinei*, din cei 91 H, care potenţial se pot schimba, se constată că 61 se schimbă rapid (sub 1 minut), 7 mai încet şi 23 foarte încet, considerîndu-se că protonii „greu de schimbat" sînt cei din regiunile α-helix, pe care această structură îi „protejează" faţă de solvent. Aplicarea acestor date la insulină arată că din cei 91 H care s-ar putea schimba (teoretic), 48 se găsesc de-a lungul legăturii peptidice, iar din aceştia 7 + 23 se schimbă greu, ceea ce sugerează că 30/48 = = 0,63, adică 63% din molecula insulinei ar fi implicată într-o structură α-helix.

Este de menţionat că această metodă nu dă rezultate suficient de exacte pentru toate proteinele, de exemplu, în cazul mioglobinei, care pe baza determinărilor de difracţie a razelor X indică incontestabil un conţinut de 77% α-helix, metoda schimbului de D arată numai 50%, de unde concluzia că există şi alţi factori care limitează schimbul protoni/deuteriu, fiind posibile şi alte forme de „protejare" faţă de solvent sau apariţia unor denaturări.

A treia formă de structură secundară periodică, *helixul de colagen*, conferă conformaţia în fire lungi a colagenului, component principal al pielii, osului, cartilagiilor etc. (cap. 1.3.5.1.2).

1.3.4.3. *STRUCTURA TERŢIARĂ ŞI CUATERNARĂ A PROTEINELOR*

Structura terţiară se referă la relaţiile sterice ale resturilor de aminoacizi care nu sînt implicate în „coloana vertebrală" liniară. Structura cuaternară apare în proteinele alcătuite din mai multe lanţuri polipeptidice şi în care acest mod de organizare presupune existenţa unor „subunităţi". Prin interacţiunile între aceste subunităţi apar anumite structuri spaţiale speciale care condiţionează funcţiile lor biologice. Delimitările între structurile secundare şi terţiare şi între acestea şi cele cuaternare sînt adesea arbitrarii ceea ce duce, uneori, la neînţelegeri în definirea şi caracterizarea lor.

Structura terţiară traduce o anumită aranjare spaţială, care determină unele proprietăţi fizico-chimice şi biologice. De exemplu, *vîscozitatea intrinsecă*: $\eta = \frac{V}{m} A$, în care V = volumul particulei, m = masa moleculară şi A o funcţie de raportul axelor moleculei, are valoarea 2,5 pentru sferele rigide şi creşte concomitent cu creşterea raportului (diferenţei) dintre axe. Pentru majoritatea protei-

Scanned with OKEN Scanner

nelor native, η este independent de gr. mol., dar depinde de aceasta pentru moleculele nonsferice; cele mai mari modificări ale vîscozității sînt cauzate de forma moleculei.

O metodă valoroasă pentru studiul structurii terțiare a proteinelor este *difracția razelor X*. Principiul metodei se bazează pe ecuația lui *Bragg*, care exprimă difracția unui fascicul de raze X (omogen) de către centrii (sau atomii) capabili să producă difracția. Relația fundamentală este $\sin \lambda = 2\ d \sin \emptyset$, în care λ = lungimea de undă a fasciculului incident; d = distanța față de cristal și $\emptyset$ = unghiul razei incidente și reflectate *(figura 1.71)*.

În practică se aplică tehnici diferite, de exemplu, materialul cristalizat, fin pulverizat, este rotit sau agitat în așa fel încît toate planurile cristalelor să primească toate orientările posibile față de razele X incidente. Se obține astfel o diagramă cu cercuri concentrice din care se deduc relațiile spațiale. O altă tehnică urmărește un singur cristal care se așază cu una din axele sale perpendicular pe fasciculul incident și se înregistrează difracția în timpul rotirii sale în jurul axei, pe o placă fotografică fixă. Metode mai perfecționate realizează rotirea simultană a cristalului și plăcii fotografice. Din diagramele obținute, pe baza poziției atomilor și electronilor în regiunile electronodense, se apreciază arhitectura moleculei. Dificultatea metodei constă în necesitatea efectuării și calculării unui număr foarte mare de diagrame, de exemplu pentru determinarea structurii mioglobinei *(Kendrew)* a fost necesară obținerea și calcularea a peste 10 000 diagrame *Fourier*, realizabile în prezent prin aplicarea computerelor.

Structura cuaternară. Multe proteine sînt alcătuite dintr-un număr de lanțuri polipeptidice independente, care nu sînt legate între ele prin legături covalente; fiecare subunitate este caracterizată printr-o structură proprie primară, secundară și terțiară. În prezent se consideră că majoritatea, dacă nu chiar toate proteinele cu gr.mol. peste 50.000, sînt alcătuite din asemenea subunități, ca de exemplu, hemoglobina, formată din patru lanțuri polipeptidice, și enzimele, alcătuite din mai multe lanțuri, disociabile în subunități monomerice cu ajutorul agenților care produc denaturarea parțială a proteinelor. Structura cuaternară

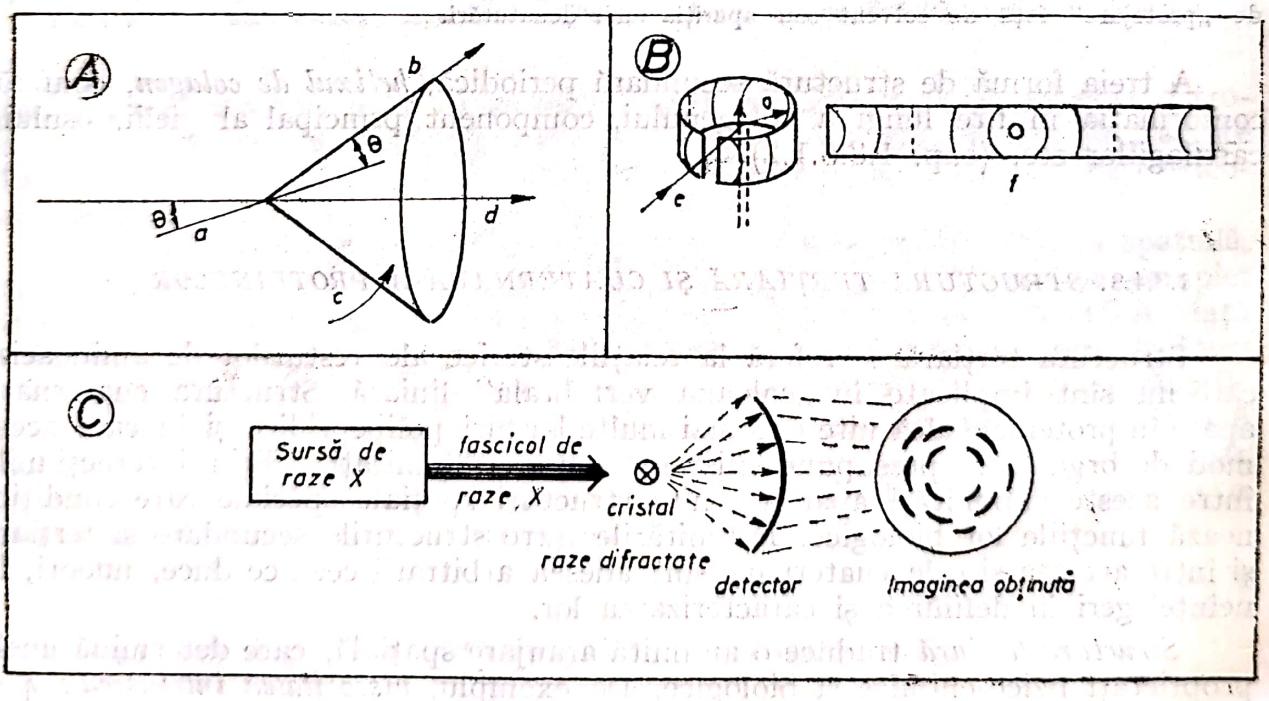


Fig. 1.71. Reprezentarea difracției razelor X produsă de cristale. A. difracția razelor X: a. planul cristalului, b. raza cu difracție maximă, c. locul difracției maxime pe diagramă, d. raza incidentă, e. unghiurile față de raza incidentă *B.* Aranjarea filmului în jurul probei pentru fotografia în pulbere (e) și diagrama desfășurată (f). *C.* Reprezentarea generală a unei instalații pentru obținerea diagramelor cu raze X.

Scanned with OKEN Scanner

a proteinelor este de interes special pentru *izoenzime*, adică a enzimelor care există în mai multe forme structurale la aceeași specie precum și în forma *complecșilor multienzimatici*, de exemplu, în cazul dehidrogenazei piruvice din *E. coli*, compusă din trei tipuri de enzime, cu gr.mol. globală de 4.000.000 și care conține 88 polipeptide distincte capabile de autogrupare și aranjare în spațiu, în condițiile amestecului părților componente.

Menționăm că și structurile terțiare și cuaternare sînt determinate de secvența aminoacizilor și sînt astfel supuse mecanismelor genetice.

1.3.4.4. *TIPURI DE FORȚE ȘI LEGĂTURI DIN MOLECULELE PROTEICE*

Universalitatea legăturii peptidice („structura primară") este unanim admisă. Secvența aminoacizilor permite multiple aranjări și apariția unui număr extraordinar de mare de peptide și proteine ; în cadrul aceluiași tip de polipeptide sau proteine apar diferențe ale secvenței unor aminoacizi, de la o proteină la alta. Asemenea secvențe determină specio-specificitatea proteinelor și polipeptidelor (insulină, hormoni hipofizari, hemoglobină, proteine plasmatice și tisulare etc.), condiționarea lor fiind genetică. De interes în caracterizarea proteinelor sînt legăturile —S—S— ; unele proteine sînt lipsite de asemenea legături, altele le conțin în același lanț polipeptidic, sau între două lanțuri (pe care le leagă) în timp ce altele au ambele tipuri de legături —S—S—.

Prezența unor aminoacizi și deci a resturilor lor laterale în anumite poziții bine determinate ale secvenței poate fi esențială sau numai accesorie. Alterarea aminoacizilor din prima categorie duce la afectarea marcată a proprietăților proteinelor, dar a celor din a doua categorie numai la modificări minime. Mici modificări ale unor aminoacizi sau înlocuirea lor cu alții (în prima categorie) pot avea efecte diferite : scăderea, abolirea sau intensificarea acțiunii biologice specifice (în cazul hormonilor, enzimelor) sau apariția unor molecule „anormale" responsabile de o serie de stări patologice, denumite și „boli moleculare" (de exemplu, hemoglobinele „patologice"). Prezența unor resturi laterale ale aminoacizilor într-o anumită poziție este o condiție necesară pentru organizarea proteinelor în structurile superioare (secundară, terțiară, cuaternară) și implicit pentru înzestrarea lor cu proprietățile biologice specifice.

În privința *tipurilor de forțe care asigură structura proteinelor* s-a menționat că în structura primară sînt implicate grupările α-NH_2 și α-COOH, care se leagă sub forma unei „coloane vertebrale", fiecare aminoacid contribuind, în aceeași măsură, respectiv cu aceeași lungime (cu excepția Pro și Hipro) în structurarea lanțului polipeptidic. Resturile din molecula fiecărui aminoacid, care nu sînt angajate în legătura —CH—CO—HN—CH—, pot să-și păstreze și să manifeste proprietățile chimice caracteristice. Pe baza acestui potențial de reactivitate sînt posibile cel puțin patru tipuri principale de interacțiuni : legături de H interpeptidice, legături de H între resturile laterale, legături apolare (hidrofobe) și legături ionice, care reprezintă forțele ce asigură organizarea superioară a proteinelor.

Legăturile de hidrogen sînt destul de slabe și se stabilesc între doi atomi electronegativi (O, N) prin intermediul unui H, datorită deficitului electronic al H legat de un atom puternic electronegativ ; atomul de H va fi atras de perechea de electroni neparticipanți ai atomului electronegativ dintr-o altă grupare și astfel se produce scurtarea distanței de atomi, care este pentru cazurile particulare

Scanned with OKEN Scanner

de 2,70 Å pentru —O—H . . . O⁻ și 3,10 Å pentru —NH . . . O⁻. În afară de legăturile de H formate de către atomii implicați în *„coloana vertebrală"* a peptidelor, asemenea legături pot apare și între resturile laterale ale aminoacizilor, de exemplu, H din —OH al Ser, Tre, Tir ; sau între gruparea amino încărcată pozitiv și gruparea carboxilică etc. *(figura 1.72)*.

Este important de precizat că moleculele apei au o mare tendință de a forma legături de H, între ele sau cu alte molecule. În condițiile intracelulare există o rețea de asemenea legături care se rup și se refac în mod continuu. Deoarece proteinele se găsesc în materialele biologice în soluții apoase, moleculele apei intră în competiție pentru grupările ce participă în legăturile de H din moleculele proteice, cu slăbirea acestora. Din acest motiv și din faptul că legăturile de H sînt destul de slabe, putînd fi rupte de energii apropiate agitației termice obișnuite, este necesar ca legăturile de H să se găsească într-un număr mare pentru a asigura o anumită conformație a moleculei proteice.

Legături apolare. Între resturile apolare ale diferiților aminoacizi din peptide (proteine) acționează forțele *van der Waals*. Părțile cu caracter de hidrocarbură ale aminoacizilor au tendința de a se asocia între ele (în soluții apoase) prin formarea unor legături apolare (hidrofobe). Argumente pentru asemenea tipuri de legături sînt faptul că între doi atomi din grupări învecinate se nasc forțe de atracție între două mase, dar o explicație mai acceptabilă este că în fiecare atom, nucleul și electronii din jurul acestuia oscilează permanent, formînd dipoli tranzitori ; în atomul învecinat se petrec fenomene similare, sincronizate cu ale primului și astfel sarcinile celor doi dipoli oscilanți sînt de semn contrar în părțile care stau față în față. Atracția dintre cei doi atomi ar fi de natură electrostatică, forța ei fiind invers proporțională cu puterea a 6-a a distanței dintre atomi, de unde rezultă că atracția nu se poate manifesta decît în cazul cînd distanța dintre atomi este mică. Asemenea forțe de atracție, între atomi

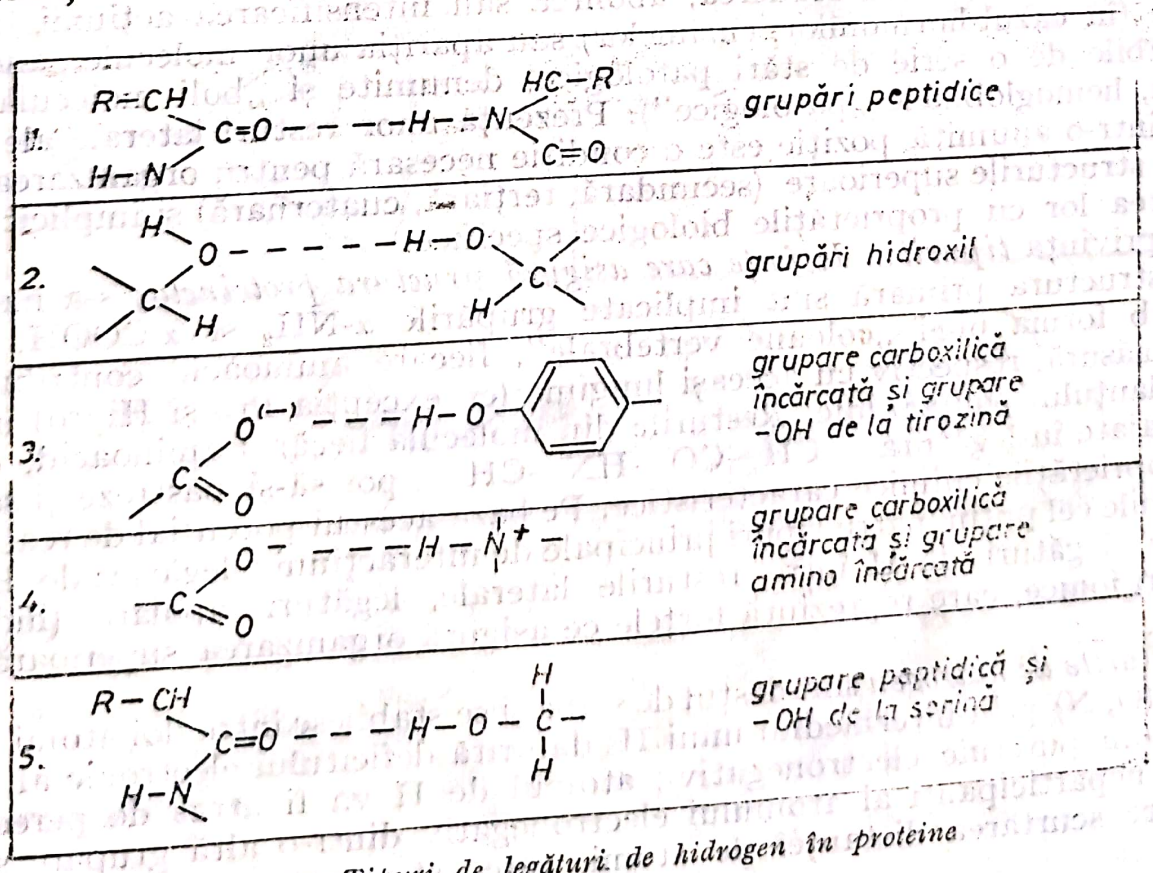


Fig. 1.72. Tipuri de legături de hidrogen în proteine.

Scanned with OKEN Scanner

sau grupări de atomi, sînt denumite *forțe van der Waals*. Pentru distanțe prea mici, însă, straturile electronice se întrepătrund și în locul forțelor de atracție apar forțe de repulsie. Distanța la care forțele de respingere se echilibrează cu cele de atracție se numește *raza van der Waals*. Valorile acestora sînt, în Å, următoarele: H = 1,2; N = 1,5; O = 1,4; P = 1,9; S = 1,85; CH_3 = 2,0; 1/2 nucleu aromatic = 1,7 *(J. D. Watson, 1965)*.

Resturile aminoacizilor (neimplicate direct în legătura peptidică) au tendința de a se orienta, în parte, tocmai datorită rețelei de legături de H existente în soluțiile apoase. Grupările apolare, proporțional cu mărimea lor, caută să vină în contact cu cît mai puține molecule de apă și de aceea resturile apolare ale aminoacizilor au tendința de a se „refugia" într-o regiune restrînsă din interiorul moleculei, unde este exclusă prezența apei. Această tendință, în sens fizic este o forță care a primit denumirea de *forță hidrofobă*. Deoarece majoritatea proteinelor conțin o proporție mare de aminoacizi cu resturi apolare, aceste legături par a fi forțele cele mai importante în condiționarea structurilor de ordin mai înalt a proteinelor. Dovada directă a fost adusă prin calcularea distanțelor dintre toți atomii mioglobinei *(J. Kendrew, 1968)*, stabilindu-se că atomii care se găsesc la distanțe de 2—3,1 Å sînt implicați în interacțiuni polare, iar cei cu distanțe de 3,1—4,1 Å în interacțiuni apolare, și, că în cazul de față, ultimele se găsesc în majoritate.

Interacțiuni polare; legături electrostatice. Legăturile electrostatice implică forțele de atracție ce se stabilesc între atomii sau grupările încărcate cu sarcini de semn contrar. Asemenea sarcini apar în resturile laterale polare ale aminoacizilor și la nivelul aminoacizilor terminali. Ele pot atrage nu numai grupările de semn contrar din molecula proteică ci și diferiți ioni sau molecule din soluție. Varietatea destul de mare a acestor legături *(figura 1.73)* este de importanță pentru arhitectura moleculei.

După cum s-a menționat, *mioglobina* are un număr mai mic de grupări polare (față de cele apolare), cu o orientare, în special, spre suprafața moleculei,

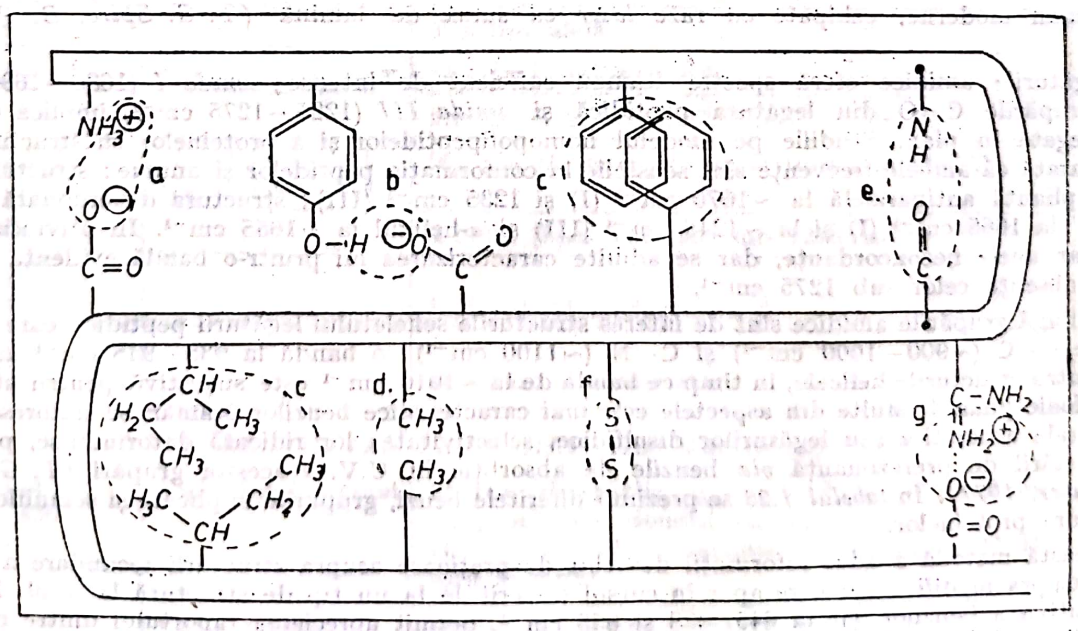


Fig. 1.73. Tipuri de legături dintre resturile de aminoacizi. a. legături ionice de ex. între un diamino- și un acid dicarboxilic b. legături de H între Tir și un acid aminat dicarboxilic c. și d. legături apolare e. legături de hidrogen interpeptide f. legătură disulfurică g. legătură între Arg și un acid aminat dicarboxilic

capabile să se lege de solvenţii polari. În cazul structurii în helix din proteinele native se sugerează că o concentrare a resturilor de acelaşi semn de-a lungul peptidei împiedică formarea helixului, în timp ce concentrarea resturilor cu încărcătură opusă o favorizează.

Legăturile disulfidice „—S—S—" sînt legături *covalente* puternice ce asigură anumite conformaţii ale lanţurilor polipeptidice de care depinde activitatea lor biologică.

Considerînd structura proteinelor în ansamblu, rezultă că ele au o structură primară şi o organizare spaţială bine definită. Cunoaşterea cauzelor care determină nivelele superioare de organizare este de mare importanţă pentru explicarea relaţiilor „structură-funcţii biologice". Posibilitatea cea mai simplă este ca structura tridimensională se fie, în întregime, determinată de structura primară, adică proteina să ia conformaţia care, în condiţiile date, este cea mai stabilă din punct de vedere termodinamic. În sprijinul acestei ipoteze se pot aduce numeroase argumente: codificarea în ADN numai a secvenţei aminoacizilor (deci a „structurii primare"); modificarea unui singur aminoacid dintr-o moleculă alcătuită din sute de aminoacizi are ca rezultat apariţia altei conformaţii (de exemplu, în hemoglobinele „anormale"); comportarea în procesul de denaturare, cu alterarea şi refacerea moleculei (conformaţiei) proteinei; reacţiile „antigen-anticorp" etc. Toate aceste constatări pledează pentru concluzia că *secvenţa structurii primare determină structurile (conformaţiile) de ordin superior şi respectiv funcţiile biologice* (*J. Kendrew*, 1970), „dogmă centrală"a biologiei moleculare.

1.3.4.4.1. IMPORTANŢA SPECTRELOR RAMAN ÎN STUDIUL PROTEINELOR

Spectrele Raman ale proteinelor relevă o serie de benzi caracteristice grupărilor moleculare prezente, a căror frecvenţă este sensibilă la influenţe structurale locale. Intensitatea spectrelor Raman fiind intrinsec scăzută s-a reuşit obţinerea unor spectre de calitate ale proteinelor prin spectrometrele Raman moderne, echipate cu raze *laser* ca sursă de lumină (*T. G. Spiro, B. P. Gaber, 1977*).

Legăturile amidice oferă spectre Raman suficient de intense; *amida I* (1630—1690 cm^{-1}) relevă grupările C=O din legătura peptidică şi *amida III* (1225—1275 cm^{-1}) implică C—N şi N—H, legate în plan. Studiile pe modelul homopolipeptidelor şi a proteinelor cu structură bine definită arată că ambele frecvenţe sînt sensibile la conformaţia peptidelor şi anume: structura β — în foaie pliantă antiparalelă la ~1670 cm^{-1} (I) şi 1235 cm^{-1} (III); structura dezordonată „la întîmplare" la 1665 cm^{-1} (I) şi la ~1245 cm^{-1} (III) şi α-helixul la ~1655 cm^{-1}. În privinţa α-helixului apar unele neconcordanţe, dar se admite caracterizarea lui printr-o bandă evidentă la 1310 cm^{-1} şi absenţa celor sub 1275 cm^{-1}.

Pe lîngă grupările amidice sînt de interes structurile scheletului legăturii peptidice care implică legăturile C—C (~900—1000 cm^{-1}) şi C—N (~1100 cm^{-1}); o bandă la 935—945 cm^{-1} apare comună pentru structurile helicale, în timp ce banda de la ~1010 cm^{-1} este sugestivă pentru structura β — în foaie pliantă. Multe din aspectele cele mai caracteristice benzilor Raman se datoresc resturilor laterale aromatice sau legăturilor disulfidice, selectivitatea lor ridicată datorindu-se, probabil, creşterii stării de prerezonanţă *via* benzile de absorbţie în U.V. a acestor grupări (*T. G. Spiro, B. P. Gaber, 1977*). În *tabelul 1.28* se prezintă diferitele benzi, grupările implicate şi semnificaţia lor în structura proteinelor.

Această metodă a adus informaţii deosebit de preţioase asupra structurii secundare a proteinelor şi asupra modificărilor care apar în cursul trecerii de la un tip de structură la altul. Intensitatea relativă a benzilor Tir la 645, 828 şi 853 cm^{-1}, permit aprecierea raportului dintre resturile „ascunse" („buried", „îngropate") şi „expuse". Studiile comparative pe soluţii şi cristale arată modificări minore pentru lizozim, ribonuclează A, lactoglobuline, inhibitorul bazic al tripsinei din pancreas şi carboxipeptidaza A, dar liofilizarea acestor proteine şi a chimotripsinogenului A şi ovalbuminei produce schimbări semnificative atît în conformaţia lanţului principal cît şi a resturilor laterale.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.28

Informaţii asupra structurii proteinelor prin benzi şi grupe
(după **T. G. Spiro, B. P. Gaber**, Ann. Rev. Bioch. **46**, 553–572, **1977**)

Origine şi frecvenţă (Δcm^{-1})	*Natura legăturii sau a grupărilor*	Informaţii structurale
I. *COLOANA „VERTEBRALĂ" („SCHELETUL") PROTEINELOR*		
1. *SEMNALE ACUSTICE*		
25–30	Părţi mari din mol. Interacţiuni posibile între subunit.	Structura generală. Interacţiuni între subunităţi
75	mod de torsiune	α-helix (tentative)
160	mod de pliere	structuri-β (tentative)
2. *SEMNALE OPTICE*		
935–945 (950 D_2O)	leg. C–C sau C_α–C–N	α-helix
900	leg. C–C	Indicator pentru schimbările conformaţionale extinse şi pierderea intensităţii cu denaturarea
1002 (H_2O) 1012 (D_2O)	C_α–C′ sau C_α–C_β	sugestive pentru foaia β-pliată
1100–1110	leg. C–N	Indicator pentru schimbările conformaţionale şi denaturare
Amida I	leg. C=O amidică	o bandă precisă sugerează structura omogenă şi leg. H; legăturile de H puternice scad frecvenţa amidei I
1655±5		α-helix
1670±3		β-antiparalelă
1665±3		structură dezordonată
1685		structură dezordonată (lipsa leg. de H)
AMIDA III	N–H în plan, leg. C–N	leg. de H puternice cresc forma amidei III
>1275		α-helix (lipsa acestuia sub 1275 cm^{-1})
1235±5 (îngustă)		foaie pliată antiparalelă β
1245±4 (largă)		structură dezordonată
II. *RESTURILE LATERALE ALE AMINOACIZILOR*		
Tirozină 850, 830 (dublet)	Ciclul fundamental	Starea OH-fenolic I_{850}/I_{830} = 9 : 10 la 10 : 7 leg. de H „expuse" cu donorii acizi; 10 : 7 la 10 : 3 leg. „ascunse" puternice –OH H la acceptorii negativi
Triptofan 1361 1338	Ciclul indol	Ambianţa ciclului: benzile înguste intense ale resturilor „ascunse". Intensitatea scade prin expunerea la schimbarea mediului (conturul benzilor dubletului 1360–1380 este sensibil la mediu)

TABELUL I.28 *(continuare)*

Origine și frecvență (Δcm^{-1})	*Natura legăturii sau a grupărilor*	Informații structurale
Fenilalanina 1006	Ciclul fenil	Conformația: Intensit. frecv./Intensit. ratei de referință cu Tirozina 664 cm^{-1} permite aprecierea raportului Phe/Tir.
Histidina 1409 (D_2O)	N-deutero-imidazol	Dovezi posibile pentru starea de ionizare, structura metaloproteinelor, transfer de protoni
—S—S— 510, 525, 540 C—S 630—670; 700—745	leg. —S—S—	Heterogenitatea conformațiilor în jurul legăturilor disulfurice; stările de orientare: de „răsucire" și „trans"
—SH 2560—2580	leg. S—H	Ambianța: gradul de deuterare
	III. *ACIZII CARBOXILICI*	
1415	grup. C(=O)O	Starea de ionizare
1730	C(=O)OH(R) leg. C=O	Complexarea cu metale

Neurotoxinele din veninurile unor șerpi prezintă predominant o structură β-foaie pliantă, cardiotoxina dintr-un pește toxic *(„Mojave rattlesnake")* este în principal α-helicală iar toxina dintr-un dedețel marin *(„Sea anemone")*, care este atît neuro-, cît și cardioactivă, apare cu un spectru dominat de resturi de triptofan „ascunse" și o coloană „la întîmplare". Proteinele din cristalinul ochiului păsărilor arată, în principal, structura α-helixului în timp ce la bovine predomină forma β, cu o structură uniformă a coloanei principale, dar cu variații în raportul Phe/Tir și cu apariția a două benzi pentru grupările S—H la 2582 și 2560 cm^{-1} și care au o mobilitate restrînsă. Spectrul virușilor plantelor și bacteriilor evidențiază prezența unor proteine de înveliș, cu structură de α-helix. Modificări se constată în trecerea din forma β în structuri „la întîmplare" pentru peptida ionoforă valinomicină și pentru gramicidină, în timpul complexării, precum și în timpul precipitării antiovalbuminei de iepure cu antigenul său *(P. C. Painter, J. L. Koenig, 1975)*.

1.3.4.5. DENATURAREA PROTEINELOR

Reacțiile de modificare a conformației proteinelor, dintre care face parte și *denaturarea* sînt importante pentru elucidarea structurii și a forțelor implicate în diferitele nivele de organizare. Denaturarea proteinelor se definește ca un proces (sau secvență de procese) prin care aranjarea spațială a lanțului polipeptidic din molecula nativă, cu o structură tipică, mai ordonată, se schimbă spre forme mai puțin ordonate *(W. Kauzmann, 1959)*. Criteriile de apreciere ale denaturării sînt numeroase și relevă *anumite proprietăți* ale proteinelor și din această cauză și metodele aplicate sînt variate *(tabelul 1.29)*.

Agenții cei mai utilizați pentru studiul denaturării proteinelor sînt: căldura, iradierea cu U.V., solvenții organici, ureea, clorhidratul de guanidină, LiBr, detergenții, variațiile de pH etc. Aceștia produc grade diferite de denaturare: completă și ireversibilă prin încălzire, reversibilă prin uree (din forma denaturată se poate obține forma inițială prin îndepărtarea ureei) etc.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.29

Criterii de apreciere a denaturării proteinelor

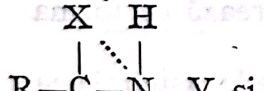
Proprietăți legate de formă	*Proprietăți legate de structură*
a. *Hidrodinamice* Coeficientul de frecare Vîscozitatea Constanta de dispersie	a. *Termodinamice* Capacitatea energetică, Comportarea la încălzire Solubilitatea
b. *Dispersia rotatorie* Dispersia luminii Dispersia razelor X	b. *Optice* Rotația specifică și dispersia Absorbția I.R. și dicroismul
c. *Microscopia electronică*	Absorbția în vizibil și U.V. Indicele de refracție

Proprietăți legate de structură și formă

a. *Chimice* Reactivitatea grupelor Schimbul H—D Comportarea liganzilor Electroforeza	b. *Biologice* Activitatea biologică (enzimatică, hormonală etc.) Caracteristicile imunologice

Eficiența relativă a diferiților agenți denaturanți exprimă, în esență, efectul lor asupra „constantei de echilibru" în transformarea formei native în cea denaturată; agentul denaturat poate acționa prin „destabilizarea" stării native, prin „stabilizarea" formei denaturate sau prin ambele. În cazul mioglobinei, după cum s-a menționat, grupările polare sînt „expuse" soluției atît în forma nativă cît și în cea denaturată, dar grupările nepolare sînt, în majoritate, „ascunse" și izolate de solvent în starea nativă și „expuse" prin denaturare. În consecință, este logic ca ureea sau alți agenți denaturați similari să acționeze prin „demascarea" grupărilor apolare, fapt confirmat experimental.

Cercetări efectuate cu un mare număr de agenți denaturați arată că cei mai eficienți au următoarea structură de bază *(J. Gordon, W. P. Jenks, 1963)*:



și în care efectul denaturant variază după natura R, X, Y; pentru X: $NH_2 > S > O$; pentru R: $NH_2 > CH_3S > CH_3O > S > O \approx H \approx CH_3$; pentru Y: $H > NH_2 >$ anioni. De aici rezultă că următorii compuși îndeplinesc condițiile unor denaturanți optimi:

Compusul	X	R	Y
Uree	O	NH_2	H
Săruri de guanidină	NH	NH_2	H
S—metil-izotiouree	NH	SCH_3	H

Calcularea schimbului energiei libere în transferul diferitelor resturi ale aminoacizilor și ale legăturii peptidice, din soluție apoasă în soluție de uree 8M, relevă că ureea stabilizează atît grupările hidrofobe cît și cele peptidice, că scade energia liberă a proteinei denaturate în raport cu structura nativă și că nu există

certitudinea că ar produce degradarea legăturii peptidice. Cercetări comparative pe CO—Hb, Met—Hb și Oxi—Hb (Hb=hemoglobină) arată că ureea participă activ în denaturarea proteinelor, probabil prin mecanisme complexe și cooperative.

Ribonucleaza, alcătuită dintr-un lanț polipeptidic cu 124 aminoacizi este modelul preferat pentru stabilirea relației dintre secvența aminoacizilor, conformația proteinelor și activitatea lor biologică (enzimatică) și respectiv pentru studiul denaturării proteinelor *(C. J. Epstein, R. F. Golberger, C. B. Anfisen, 1963; C. B. Anfisen, 1973, 1974)*. La baza acestor cercetări stă posibilitatea desfacerii progresive a celor patru legături —S—S— din molecula ribonucleazei și urmărirea, în paralel, a conformației și activității enzimatice. În prezență de β-mercaptoetanol la pH = 7 și 37°, reducerea legăturilor —S—S— este destul de limitată; în prezența unor agenți denaturați, ca de exemplu, ureea 8 M sau guanidin-HCl 6 M, modificările sînt mult mai profunde, cu ruperea legăturilor noncovalente. Lanțurile polipeptidice lipsite de legăturile native trec într-o conformație „la întîmplare" („random-coil"), dovedită prin proprietățile fizico-chimice (vîscozitate, spectrul de rotație optică etc.). Astfel, sub efectul β-mercaptoetanolului și ureei, se reduc toate grupările —S—S— și proteina astfel denaturată primește o conformație lipsită de activitate enzimatică; prin eliminarea prin dializă a β-mercaptoetanolului și ureei și reoxidarea la aer a grupărilor —SH se formează din nou molecula ribonucleazei native *(figura 1.74)*. Această experiență arată că secvența aminoacizilor conține întreaga informație necesară pentru a determina conformația (structura complexă tridimensională) a ribonucleazei, fapt confirmat și pentru alte proteine. Este interesant că în cazul cînd reducerea se produce în condițiile menționate (cu β mercaptoetanol și uree 8 M), dar reoxidarea are loc în condiții diferite și anume, în prezență de uree, ribonucleaza astfel „refăcută" manifestă numai 1% din activitatea enzimatică a moleculei inițiale. Explicația este că cele patru perechi de grupări —SH (formate prin reducere în condițiile date) se pot lega între ele, teoretic, în 105 moduri diferite, dar dintre acestea este activă numai una singură — care corespunde împerecherii din ribonucleaza nativă-, celalalte 104 reprezintă conformații lipsite de activitate enzimatică, de unde denumirea de ribonucleaze „dezordonate", „îmbrîncite" („scrambled"). Acestea, în prezența urmelor de β-mercaptoetanol, se pot transforma în forma nativă activă (în aproximativ 10 ore); faptul că această transformare nu implică schimburi de energie liberă sugerează că forma nativă este cea mai stabilă termodinamic *(L. Stryer, 1975)*.

Concluzia că proteinele native au o structură terțiară care le asigură cea mai mare stabilitate rezultă din proporția lor mai mare în proteinele denaturate și regenerate, față de alte tipuri de conformații posibile, întîmplătoare *(tabelul 1.30)*.

TABELUL 1.30

Refacerea moleculelor proteinelor ce conțin legături —S—S—

(după C. J. Epstein, R. F. Goldberger, C. B. Anfisen, 1963)

Proteina	Legături disulfidice	Activitatea regăsită (%)	Refacere la întîmplare (%)
Ribonuclează (pancreatică)	4	95—100	aprox. 1
Lizozim (din albuș de ou)	4	50—80	„ 1
Fosfatază alcalină (E. coli)	2	80	„ 33
Pepsinogen (porc)	3	50	„ 6,7
Albumină serică (umană)	17	50	?
Insulină (bovină)	3	5—10	„ 6,7

Scanned with OKEN Scanner

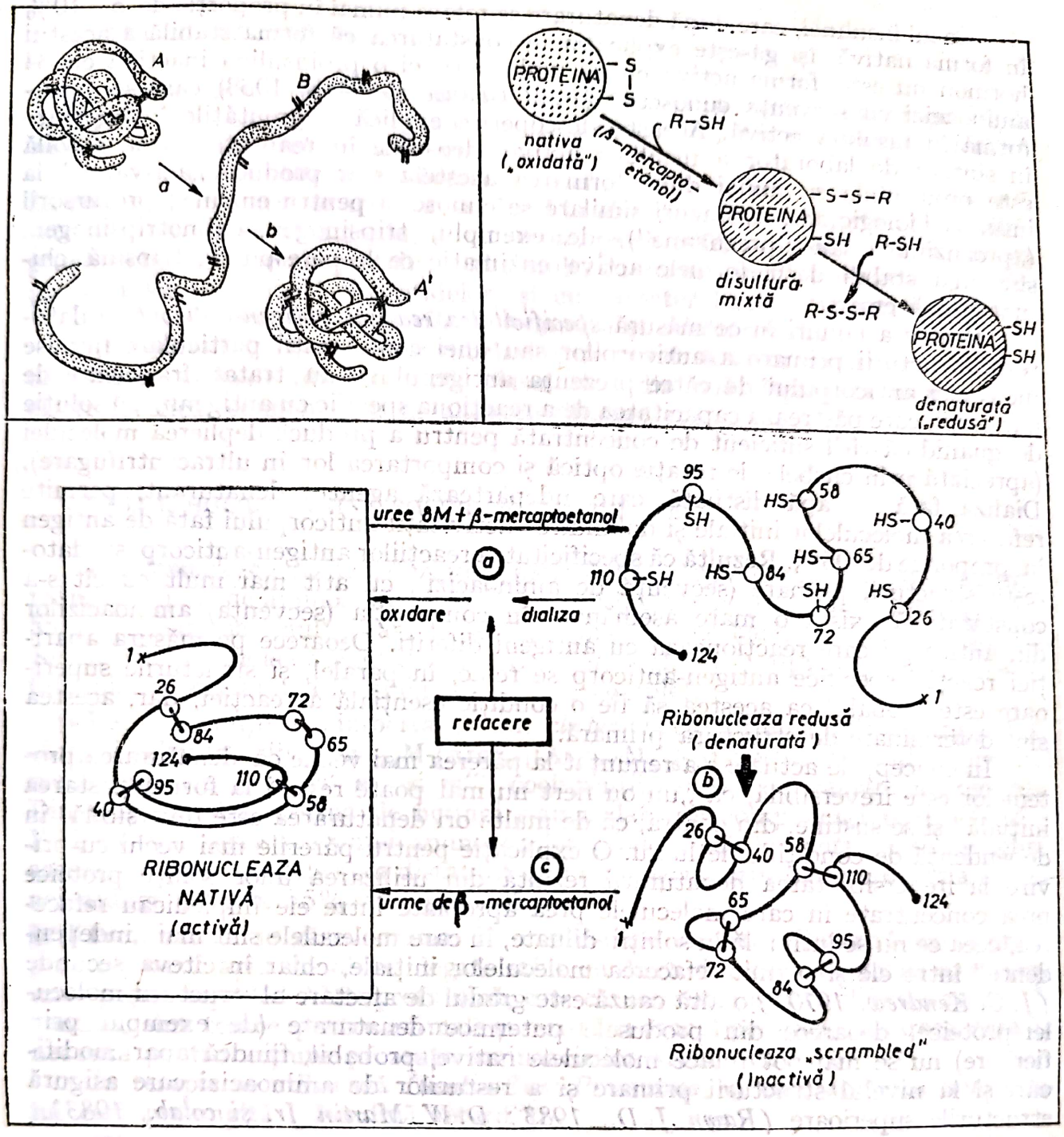


Fig. 1.74. Denaturarea şi refacerea moleculelor proteinelor. I. Molecula iniţială A, cu legături intramoleculare —S—S— (notate cu =) redusă cu uree + β-mercaptoetanol (a) se depliază la forma „liniară" (B); după îndepărtarea agentului denaturant şi oxidare (b) se reface spontan molecula iniţială (A'). *(După C. J. Epstein, R. F. Goldberger, C. B. Anfisen, 1963).* II. Ilustrarea mecanismului general de denaturare al proteinelor cu legături disulfurice (—S—S—) III. *a.* Denaturarea ribonucleazei native (activă) şi regenerarea ei din forma redusă (denaturată, inactivă) după îndepărtarea prin dializă a agenţilor denaturanţi (uree + β-mercaptoetanol) şi oxidarea grupărilor —SH (la aer) *b.* Transformarea formei denaturate în ribonucleză cu legături —S—S— greşite („scrambled") inactivă enzimatic *c.* Rearanjarea ribonucleazei inactive („scrambled") în ribonucleaza cu legături corecte, activă *(după C. B. Anfisen, 1964: L. Stryer, 1975).*

Cazul insulinei, care după denaturare se reface numai în proporție de 5—10% în forma nativă, își găsește explicația în constatarea că forma stabilă a acestui hormon nu este forma activă cu 51 aminoacizi ci o proinsulină inactivă cu 84 aminoacizi cu secvența cunoscută (*R. B. Chance* și colab. 1968) care se transformă în insulina activă. Această descoperire explică și greutățile întîmpinate în sinteza de laborator a insulinei active, deoarece în realitate forma stabilă este proinsulina și numai după formarea acesteia s-ar produce „activarea" la insulina biologic activă. Cazuri similare se cunosc și pentru enzime; precursorii („proenzime" sau „preenzime"), de exemplu, tripsinogen, chimotripsinogen, sînt mai stabili decît formele active enzimatic ce le corespund: tripsină, chimotripsină etc.

Pentru a lămuri în ce măsură *specificitatea reacției antigen-anticorp* se datorește structurii primare a anticorpilor sau unei conformații particulare impuse moleculei anticorpului de către prezența antigenului s-au tratat fragmente de anticorpi, care păstrează capacitatea de a reacționa specific cu antigenii, cu soluție de guanidină-HCl suficient de concentrată pentru a produce deplierea moleculei (apreciată prin curbele de rotație optică și comportarea lor în ultracentrifugare). Dializa față de apă distilată, care îndepărtează agentul denaturant, permite refacerea moleculelor inițiale și dobîndirea activității anticorpului față de antigen în proporție de 95%. Rezultă că specificitatea reacțiilor antigen-anticorp se datorește structurii primare (secvența de aminoacizi), cu atît mai mult cu cît s-a constatat că există o mare asemănare în compoziția (secvența) aminoacizilor din anticorpii care reacționează cu antigeni diferiți. Deoarece pe măsura apariției reacției specifice antigen-anticorp se refac, în paralel, și structurile superioare este probabil ca acestea să fie o condiție esențială a reacției, dar, acestea sînt determinate de structura primară.

În concepțiile actuale s-a renunțat la părerea mai veche că denaturarea proteinelor este ireversibilă, că „un ou fiert nu mai poate reveni la forma și starea inițială" și se susține, din contră, că de multe ori denaturarea este reversibilă, în dependență de condițiile de lucru. O explicație pentru părerile mai vechi cu privire la ireversibilitatea denaturării rezultă din utilizarea unor soluții proteice prea concentrate în care moleculele prea apropiate între ele împiedicau refacerea, ceea ce nu se întîmplă în soluții diluate, în care moleculele sînt mai „independente" între ele și permit refacerea moleculelor inițiale, chiar în cîteva secunde *(J. C. Kendrew, 1970)*; o altă cauză este gradul de afectare al structurii moleculei proteice, deoarece din produsele puternice denaturate (de exemplu, prin fierbere) nu se mai pot reface moleculele native, probabil, fiindcă apar modificări și la nivelul structurii primare și a resturilor de aminoacizi care asigură structurile superioare *(Rawn J. D., 1983; D. W. Martin Jr. și colab., 1983)*.

1.3.5. PROTEINE DE INTERES BIOLOGIC ȘI FARMACEUTIC*

Aprecierea că există în organismul uman 40.000 de feluri de proteine *(H. D. Jakubke, H. Jesschkeit, 1975)* sau chiar 100.000 și respectiv 10^{10} posibilități de proteine diferite în organismele vii (*A.L. Lehninger*, 1975) relevă clar dificultățile descrierii și caracterizării și imposibilitatea prezentării lor integrale.

* În prezentul capitol se descriu numai unele grupe de proteine, revenind cu precizări și detalii în capitolele și respectiv volumele următoare.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.5.1. *HOLOPROTEINE*

În lipsa unor criterii mai precise de clasificare se recurge la proprietățile de *solubilitate*, care permit gruparea holoproteinelor, *proteine simple alcătuite numai din aminoacizi* în două grupe:

1. *Proteine solubile* sau *globulare*, cu coeficientul de frecare $f/f_0 = 1{,}1 - 1{,}5$. La rîndul lor, tot atît de arbitrar, se divid în *globuline*, care precipită pînă la 50% saturare, cu sulfat de amoniu, și *albumine*, peste 50% saturare. Tot în această grupă se includ și unele proteine mai simple, cu gr. mol. mică (ceea ce ar justifica plasarea lor în grupa polipeptidelor) și cu caracter bazic: histone, protamine.

2. *Proteine insolubile, fibrilare* denumite și *scleroproteide*.

Alte criterii de clasificare și subclasificare se referă la originea lor: vegetale, bacteriene, animale (din țesuturi, plasmatice, din ouă, lapte), la migrarea lor electroforetică, comportarea în ultracentrifugare etc.

1.3.5.1.1. HOLOPROTEINE SOLUBILE (GLOBULARE)

Protaminele, cu gr. mol. de aproximativ 5.000, conțin în molecula lor un număr redus de tipuri de aminoacizi (de obicei 6—9) între care predomină arginina (35—55% și chiar mai mult), care le conferă un caracter bazic (pH_i în jur de 12). Restul sînt aminoacizi neutri: Gli, Ala, Ser, Val, Pro; alții se găsesc în cantități mici iar cei aromatici și cu sulf lipsesc complet.

Reprezentanții mai importanți sînt *clupeina*, cu formula: $Pro\text{-}[(Arg)_4\text{-}M_2]_n\text{-}Arg_2$ și *salmina*: $Pro\text{-}(Arg)_m M\text{-}(Arg)_{m'}[(Arg)_{m''}M_2]_6\text{-}Arg_{m'''}$ în care M reprezintă monoaminoacizii iar m', m'' și m''', coeficienții, uneori cu valoare neprecizată. Din clupeina din sperma de heringi s-au izolat trei componenți puri: *YI*, *Z* și *Y II* cu precizarea secvenței aminoacizilor *(figura 1.75)*. Pentru a se evidenția asemănările structurale s-au distanțat unii aminoacizi prin linii; proporția argininei ajunge pînă la 75% din moleculă.

Protaminele se găsesc numai în organismele animale. Datorită caracterului puternic bazic apar de obicei legate salin cu ADN din nucleii celulari ai spermei unor pești; raportul ADN/protamină, este caracteristic pentru diferite specii. În general, sînt toxice pentru animale și rezistă la atacul pepsinei, deoarece aceasta necesită pentru acțiune prezența aminoacizilor aromatici.

În terapie se utilizează *Insulin-Zinc-Protamina*, în care acțiunea hormonului este prelungită („Insulină retard").

Histonele au, de asemenea, caracter bazic și sînt solubile în acizi. Se pot obține prin extracția cu acizi diluați (de exemplu, HCl 0,2 N) și precipitarea din acesată soluție prin alcalinizare la pH 10 sau cu acetonă sau prin relargarea

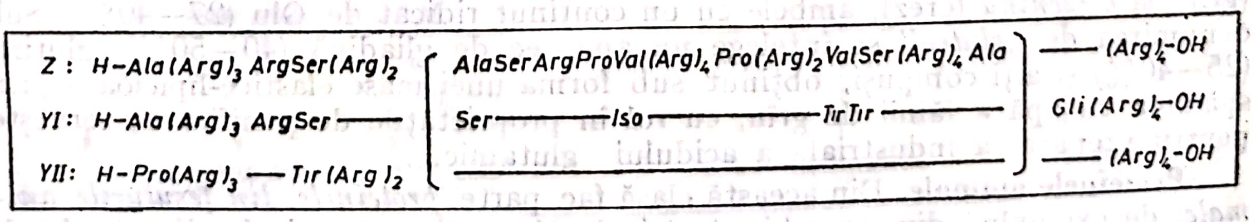


Fig. 1.75. Componentele din clupeină

cu săruri neutre. Spre deosebire de protamine, ele sînt nedializabile şi hidrolizate de pepsină.

Stabilirea structurii histonelor întîmpină greutăţi din cauza eterogenităţii lor (amestecuri de proteine bazice cu proprietăţi similare). Iniţial s-au conturat trei grupe, după conţinutul lor în Arg şi Liz: foarte bogate în Liz; cu conţinut mijlociu de Liz şi foarte bogate în Arg, dar, în cadrul acestora apar diferite subgrupe, fiind cunoscute aproximativ 20 tipuri de histone diferite biochimic, cu gr. mol. între 8.400 şi 22.000. Histonele joacă un rol important în combinaţie cu ADN cromozomial, cu care se găsesc în raport destul de fix: 1 mol histonă pentru un segment de 25 perechi de baze din ADN. Ele lipsesc de la bacterii şi se consideră că au apărut în cursul evoluţiei (filogeniei) în paralel cu diferenţierea tisulară, care necesită controlul unui număr oarecare de gene, fiind admis rolul lor de represori ai biosintezei ARN, dependentă de ADN. *(a se vedea: 1.3.6.7).*

Globinele sînt holoproteine prezente în structura mioglobinei şi hemoglobinelor *(a se vedea 1.3.8.3.2).*

Proteinele vegetale se clasifică după originea lor, de exemplu, cele din frunze (citoplasmatice, cloroplastice), din rădăcini, fructe, seminţe etc., şi după solubilitatea lor: *albumine* (solubile în apă), *globuline* (solubile în soluţii de săruri neutre), *prolamine* (solubile în alcool 70%) şi *gluteline* (solubile în alcalii).

Albuminele sînt larg răspîndite în regnul vegetal, de exemplu, în seminţe: *legumelina* (mazăre, soia), *leucozina* (grîu, secară, ovăz), *ricina* (seminţele de ricin), toate lipsite de Cis, Met, Ser, Tir şi HiPro şi sărace în Trp. Unele sînt toxice: ricina, crotina (din seminţele de *Crotus tiglicum*) falina (din ciuperca *Amanita phalloides*); asemenea *toxalbumine vegetale* au proprietatea de a aglutina, similar anticorpilor propriu-zişi, globulele roşii din sîngele animalelor, de unde denumirea de *fitoaglutinine* (pseudoantigeni).

Globulinele vegetale, cu diferite structuri, se găsesc mai ales ca substanţe de rezervă în seminţe, reprezentînd la leguminoase şi olegianoase aproximativ jumătate din totalul de proteine. În general, sînt bogate în Glu şi Asp, de unde caracterul lor mai acid decît al albuminelor. Ca reprezentanţi se pot cita *legumina* (gr. mol. 330.000) din fasole, mazăre, linte; *faselina* din fasolea albă; *vicilina* (gr. mol. 186.000) din seminţele de *Vicia faba; glicinina* din soia, iar din seminţele olegianoaselor: *edestina* (gr. mol. 310.000) din cînepă; *corilina* din alune; *juglandina* din nuci etc.

Prolaminele, insolubile în apă şi soluţii saline, au proprietatea de a se dizolva în alcool de 50—80%, ceea ce le diferenţiază de alte holoproteine. Par a fi răspîndite numai în graminee, din care s-au obţinut: *gliadina* (grîu, secară), *hordeina* (orz), *zeina* (porumb), *avenina* (ovăz). Se caracterizează printr-un conţinut ridicat de Glu (27% în zeină şi 46% în gliadină), Pro (10—13%); Gli se găseşte în cantităţi mici (1%) sau lipseşte (hordeina, zeina); Liz (sub 1%) şi triptofanul în cantităţi foarte mici (0,2% în zeină).

Glutelinele sînt insolubile în apă, alcool şi soluţii saline, dar se dizolvă în alcalii diluate, din care precipită prin acidulare. Mai răspîndite sînt *glutenina* (grîu) şi *orizenina* (orez), ambele cu un conţinut ridicat de Glu (27—40%). Sub denumirea de *„gluten"* se înţelege un amestec de gliadină (40—50%), glutină (25—40%) şi alţi compuşi, obţinut sub forma unei mase elastice-lipicioase prin spălarea cu apă a făinii de grîu, cu rol în proprietăţile de panificare; serveşte pentru prepararea industrială a acidului glutamic.

Proteinele animale. Din această clasă fac parte *proteinele din ţesuturile animale,* de exemplu, din muşchi, *proteinele plasmatice, proteinele din produsele*

Scanned with OKEN Scanner

de origine animală: ouă, lapte etc. În general proteinele animale au o valoare alimentară superioară celor vegetale, datorită faptului că au o varietate și un conținut mai mare de aminoacizi esențiali, necesari organismului și pe care nu-i poate sintetiza.

Proteinele din ou diferă după specie și localizarea lor.

Gălbenușul de ou conține o cantitate mică de apă, ceea ce face ca reziduul uscat să reprezinte aproximativ 50%, proteinele 16,6% și lipidele 32,6%. O parte din acestea apar ca cenapse lipido-proteice: *vitelina*, *lipovitelina*, *fosfovitina*, *livetina* etc.

Albușul de ou, spre deosebire de gălbenuș, este o soluție apoasă cu 10% proteine, săracă în glucide și lipide, reprezentînd astfel un material utilizat în studiul proteinelor. Aplicarea diferitelor metode de separare a proteinelor (ultracentrifugare, electroforeză, precipitări etc.) a permis izolarea unei serii de fracțiuni, care diferă între ele după metodele utilizate. Prin electroforeză la pH 7—8 se separă, în ordinea mobilității descrescînde: *ovalbumina* (64,9%), *ovomucoidul* (9,2%), *globulinele* (8,7%), *connalbumina* (13,8%) și *lizozimul* (3,4%); ultracentrifugarea la 50.000 × g permite izolarea *ovomucinei* (2%). În albuș s-a identificat și *avidina* (sub 0,1%). Prin precipitare fracționată cu sulfat de amoniu se obțin 5 grupe de holoproteine *(figura 1.76)*, neomogene, care pot fi purificate și separate în continuare prin reprecipitări sau alte metode.

Ovalbumina (gr. mol. 45.000 și pH_i 4,85) conține aproximativ 2% glucide și este eterogenă electroforetic, avînd cel puțin 3 fracțiuni, care diferă între ele prin conținutul în fosfați și prin comportarea față de acțiunea unor enzime.

Connalbumina (gr. mol. 87.000 și pH_i 6,8) este omogenă electroforetic și are proprietatea de a lega metale (Fe, Cu, Zn).

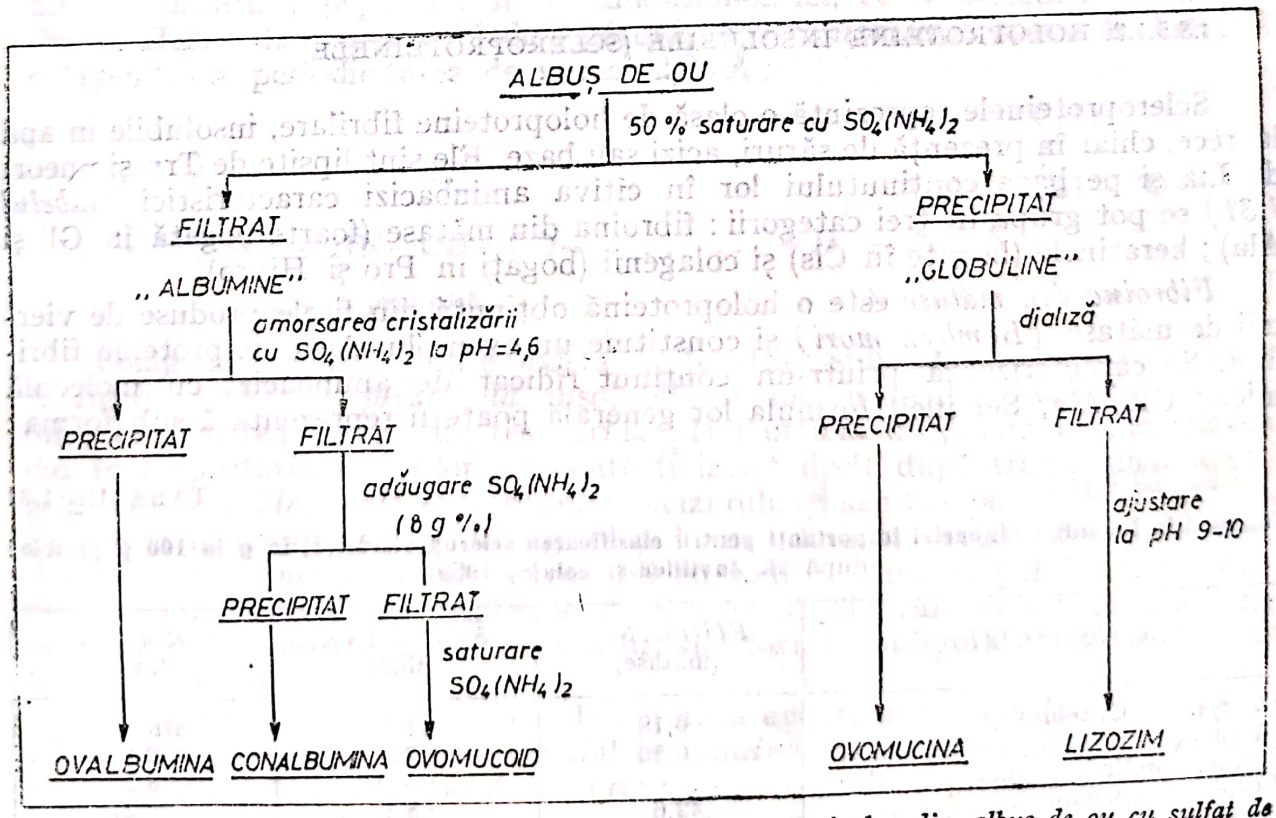


Fig. 1.76. Schema simplificată a precipitării fracționate a proteinelor din albuș de ou cu sulfat de amoniu

Ovomucoidul (gr. mol. 28.000) este o glicopeptidă eterogenă electroforetic, cu acțiune antitripsină.

Globulinele reprezintă un complex, care în imunoelectroforeză arată 9 fracțiuni.

Lizozimul (gr. mol. 14.800) cu caracter bazic (pH_i 11) manifestă activitate litică asupra bacteriilor. Lizozimul din lacrimi și secrețiile nazale are un rol protector, antibacterian.

Ovomucina este o glicopeptidă electroforetic eterogenă.

Avidina (pH_i 10) apare în trei forme: un complex instabil cu ADN *avidina NA* (gr. mol. 66.000); *avidina A* (gr. mol. 68.000), solubilă și lipsită de ADN și în complex cu o glicoproteină acidă, *avidina XA*. Avidina se unește cu biotina (în raport de 1:2 mol) sub forma unui complex rezistent la acțiunea enzimelor proteolitice și sustrage astfel biotina, producînd carența biotinică; prin fierbere avidina se denaturează și eliberează biotina (a se vedea *2.1.12*).

Proteinele din lapte aparțin la două grupe principale: *caseinele* (heteroproteide) și proteinele serului de lapte: *albumine* și *globuline* (holoproteine). Fracțiunea „globulinică" este alcătuită din *globuline adevărate* (euglobuline) și *pseudoglobuline*. Unele prezintă proprietăți imunologice de interes special în primele zile de alimentație ale noului născut; din colostru (laptele din primele zile) s-a izolat și un *inhibitor al tripsinei*. Fracțiunea „albuminică" este formată din β-lactoglobulina lui *Palmer* (gr. mol. 35.000) și α-lactalbumina (gr. mol. 16.000).

Proteinele din ou și lapte au o deosebită valoare nutritivă, ele asigurînd, în cazul oului, dezvoltarea din masa acestuia a unui organism viabil, iar în cazul laptelui, dezvoltarea copilului, în perioada sa de creștere maximă.

1.3.5.1.2. HOLOPROTEINE INSOLUBILE (SCLEROPROTEINELE)

Scleroproteinele reprezintă o clasă de holoproteine fibrilare, insolubile în apă la rece, chiar în prezență de săruri, acizi sau baze. Ele sînt lipsite de Trp și uneori de Liz și pe baza conținutului lor în cîțiva aminoacizi caracteristici *(tabelul 1.31)* se pot grupa în trei categorii: fibroina din mătase (foarte bogată în Gli și Ala); keratinele (bogate în Cis) și colagenii (bogați în Pro și Hipro).

Fibroina din mătase este o holoproteină obținută din firele produse de viermii de mătase *(Bombyx mori)* și constituie un exemplu clasic de proteină fibrilară. Se caracterizează printr-un conținut ridicat de aminoacizi cu moleculă mică: Gli, Ala, Ser încît formula lor generală poate fi reprezentată sub forma:

TABELUL 1.31

Compoziția în unii aminoacizi importanți pentru clasificarea scleroproteidelor, în g la 100 g proteină (după M. Javillier și colab., 1959)

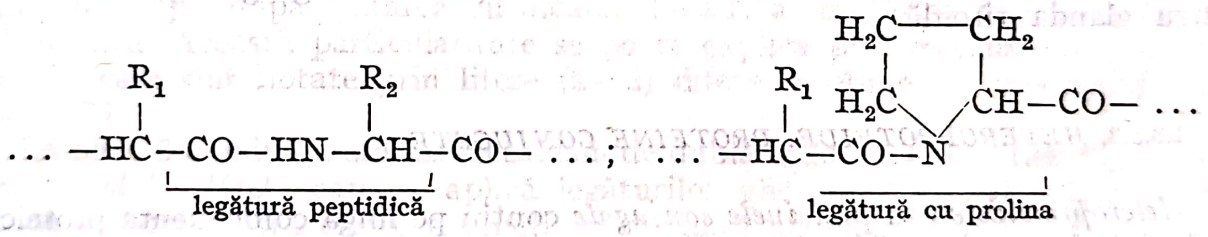
AMINOACIZI	*FIBROINA* (mătase)	*KERATINA* (lînă)	*COLAGEN* (os)
Cistină + Cisteină	0,18	11,3	urme
Prolină	0,59	7,3	10,1
Hidroxiprolină	—	—	8,2
Glicocol (glicină)	42,6	5,1	26,2
Alanina	34,37	3,7	9,3

$[Gli_3Ala_2Ser_1X_1]_n$; cei trei aminoacizi menționați, împreună cu Tir, reprezintă 90% din molecula sa.

Keratinele sînt o grupă de scleroproteine răspîndite în lînă, păr, coarne, unghii, pene, solzi, caracterizate prin conținutul ridicat în cistină (10% în keratina de păr) și care le conferă proprietăți speciale: rezistența mecanică și la agenții chimici și enzimatici. Pepsina hidrolizează puțin fibrele de lînă (sub 10% din greutatea totală), dar atacul enzimatic are loc rapid pe keratinele a căror legături —S—S— au fost în prealabil alterate prin oxidare (de exemplu, cu acid peracetic) sau reducere (de exemplu, cu bisulfit), ceea ce relevă clar rolul moleculelor de cistină în rezistența lor.

Colagenii sînt holoproteine cu rol de susținere și menținere a structurii organelor și țesuturilor, prezente în tot regnul animal (cu excepția protozoarelor) fiind cele mai abundente proteine din organismul mamiferelor (30—35% din proteinele totale). Ele constituie proteinele de structură ale țesutului conjunctiv, găsindu-se în cantități mari în piele, ligamente, tendoane, matricea osului (aproximativ 40% din N proteic) și în cantități mai mici în mușchi, plămîn, rinichi, ficat, splină (sub 6% din N proteic).

Colagenul mamiferelor apare pe secțiunile histologice sub formă de fibre ce se colorează cu eozina în roșu; la microscopul electronic, ele apar alcătuite din filamente cu lungime de cîțiva microni și diametrul de 200—2000 Å, cu striațiuni transversale, lungimea unei „perioade" (bandă întunecată-bandă clară) fiind în medie de 640 Å. Colagenul conține 19 feluri de aminoacizi, în proporții diferite: Gli (27%), Arg (15%); Trp și Cis lipsesc, în schimb apar aminoacizi caracteristici: Pro (9%) și HiPro (8%); ultimul nu se găsește în alte proteine, ceea ce permite dozarea colagenului pe baza conținutului în HiPro. Spre deosebire de legătura peptidică dintre alfa-aminoacizi, cu o periodicitate de 3,4 Å, Pro și HiPro dau un alt fel de legătură, și o conformație specială „helixul de colagen", cu periodicitatea de numai 2,86 Å:



Colagenul „nativ" poate exista în țesuturi sub trei forme (*A. Delaunay, B. Bazin,* 1969): *a. principală,* insolubilă în mediu neutru sau acid (o parte din acesta poate fi extras din țesuturi la pH neutru la 60°, denumit „eucolagen", dar în majoritatea cazurilor nu poate fi izolat decît după transformarea sa în gelatină), *b. acidosolubil,* extractibil cu acizi diluați sau tampoane de citrat acide (*Orehovici* îl denumește „procolagen" și îl consideră ca precursor al colagenului din fibre) și *c. neutrosolubil,* extractibil cu soluții saline la pH 7—8, constituit esențial din *tropocolagen* (molecule de monomeri din care se elaborează fibrele de colagen, de aceea el apare în țesuturi sub formă nonfigurată sau ca filamente fine fără structură).

Colagenul nativ este rezistent la acțiunea agenților chimici (acizi, baze), dar prin fierbere se transformă ireversibil în *gelatină.* Tropocolagenul (colagen nativ nepolimerizat) nu este atacat de proteazele obișnuite; plecînd de la colagen, tripsina eliberează peptide mai mici, relativ bogate în tirozină, dar lipsite de HiPro. Colagenul este degradat *in vivo* și *in vitro* de către enzime specifice, *cola-*

Scanned with OKEN Scanner

genaze, considerate la început de origine bacteriană *(Clostridium)* şi identificate ulterior în ţesuturile animale şi umane, produse de celulele epiteliale şi endoteliale.

Gelatina este un produs de degradare parţială ireversibilă a colagenilor din piele sau oase (piftie, răcituri) care se obţine, industrial, prin tratarea acestora cu $Ca(OH)_2$ sau acizi (pH 3,5) şi extragere cu apă la 60°; la rece se prinde într-o masă solidă.

F.R.IX prevede „*Gelatinum*" (gelatina) obţinută prin hidroliza parţială a ţesuturilor animale care conţin colagen, extracţie cu apă, fierbinte, purificare şi uscare. Se prezintă ca foi subţiri, flexibile, groase de cca 0,5 mm, lucioase, transparente slab gălbui; granule gălbui sau pulbere alb-gălbuie; fără miros şi gust. Este solubilă în apă la cald, obţinîndu-se un lichid lipicios, transparent sau uşor opalescent; solubilă în acid acetic şi în glicerină 85% la cald; insolubilă în apă rece, cu care se îmbibă, absorbind o cantitate de 5—10 ori mai mare decît greutatea sa; practic insolubilă în alcool, eter, cloroform, benzen, sulfură de carbon şi uleiuri fixe. „*Gelatina Zinci Oxidi*" (Gelatină cu oxid de zinc) conţine 90—110% oxid de zinc şi 90—110% glicerină faţă de cantităţile prescrise (F.R.IX).

Elastina este o scleroproteină găsită în cantitate mai mare în media aortei. Are un conţinut ridicat de Gli (27%), Ala (21%) şi Pro (13,5%), la fel ca şi colagenul, dar spre deosebire de acesta, este mai săracă în HiPro (1,6%), monoaminodiacizi şi diaminomonoacizi şi lipsită de Met şi His. Este mult mai rezistentă la acţiunea acizilor şi enzimelor proteolitice obişnuite dar este degradată de o enzimă specifică, *elastaza*, din extractele pancreatice *(Balo, Banga, 1950)*.

Scleroproteine halogenate. Scleroproteine care conţin în special iod se găsesc la spongieri, de ex. *gorgonina* cu 0,2—1,5% I şi chiar 7% I (din *Eucinella verucosa*) şi concentraţii variabile de brom (sub 1%) şi clor (sub 0,2%). *Spongiinele* conţin de asemenea cantităţi variabile de halogeni, după specie, dar în general sub 1% Br sau I *(J. Roche, 1952)*. Compoziţia unor scleroproteide este cunoscută şi s-a constatat că halogenii apar în special sub forma derivaţilor de tirozină, predominînd 3,5-diiodotironina (acidul iod-gorgonic), de interes pentru glanda tiroidă.

1.3.5.2. *HETEROPROTEIDE. PROTEINE CONJUGATE*

Heteroproteidele sau *proteinele conjugate* conţin pe lîngă componenta proteică (alcătuită din aminoacizi) şi o parte nonproteică, denumită partea *prostetică*, pe baza căreia se clasifică în diferite grupe: glicoproteide, fosfoproteide, nucleoproteide, cromoproteide.

1.3.5.2.1. GLICOPROTEIDE

Glicoproteidele conţin în molecula lor, pe lîngă acizii aminaţi, şi diferite glucide sau derivaţi glucidici *(a se vedea 1.1.4.1; 1.1.4.3; 1.1.4.6)*. Deoarece prezenţa acestora este constantă, dar mică, în numeroase proteine (de exemplu, serumalbumine, ovalbumine etc.) s-a convenit să se considere ca glicoproteide numai proteinele care conţin cel puţin 5% glucide, limită peste care ele manifestă evident proprietăţile caracteristice glucidelor.

Structura părţii glucidice. Moleculele de glucide implicate în glicoproteide sînt foarte variate. Dintre *oze* apar: D-xiloza, mai frecvent manoza şi galactoza,

rar glucoza, şi foarte rar fructoza, ramnoza şi fucoza; dintre *derivaţii aminaţi* ai ozelor apar foarte frecvent glucoziamina sau galactozamina, mai ales sub forma acetilată (de obicei apare numai una); dintre *acizii uronici*, în special acidul D-glucuronic. Un component prezent în unele glicopeptide este acidul *neuraminic* sau *nonulosoaminic* (cu 9 at. C şi cu grupare carboxilică, aminică şi carbonilică) şi derivatul său acetilat, *acidul sialic*. Enzima *neuramidinază* (din vibrionul cholerei şi diverse virusuri: al gripei, oreionului etc.) este o α-cetozidază capabilă să hidrolizeze legătura ozidică a N-acetilului din acidul sialic, cu micşorarea vîscozităţii glicoproteidei care înconjoară bacteria sau virusul, uşurînd astfel pătrunderea acestora în celulă.

Legăturile dintre partea proteică şi polizaharidică. Pentru a înţelege aceste legături (vezi 1.1.4.6) este necesar să amintim că termenul *mucopolizaharid* defineşte „mucopolizaharidele de origine animală conţinînd ozamine şi care se găsesc fie pure, fie în stare de combinaţii saline cu proteinele" *(Meyer, 1938)* şi *mucopolizaharide acide* „heteroglicani ce conţin unităţi dizaharidice ce alternează regulat şi care sînt constituite dintr-o hexozamină şi un acid uronic" *(Jeanloz, 1962)*. Se ştie astăzi, însă, că procedeele de extracţie şi fracţionare elimină scheletul polipeptidic legat de lanţurile heteroglicozidelor prin legături O-glicozidice-alcali-labile. Aceste lanţuri de polizaharide nu reprezintă deci decît o parte a structurii mucopolizaharidei acide; progresul metodelor preparative a permis ca în prezent să se realizeze o definire globală a moleculei *(J. C. Jardillier, J. Agneray, R. Havez, 1970)*.

În sensul celor menţionate apare de interes legătura O-*glicozidică*, dintre gruparea reducătoare a glucidelor şi funcţia —OH a aminoacizilor hidroxilaţi: Ser, Tre, hidroxi-Liz sau HiPro din lanţul peptidic. Rolul esenţial al Ser în legătura peptidă-glucidă *(H. Muir, 1958)* a fost susţinut pe baza constatării că Ser este singurul aminoacid a unei mucopolizaharide a cărui conţinut nu variază după proteoliză şi care se găseşte în fragmentele peptidice mici din zona de legătură neafectată de proteaze *(B. Anderson şi colab., 1965)* şi care nu se mai regăseşte după tratarea cu alcalii, dovadă a implicării sale în legătura O-glicozidică. Această particularitate se poate explica prin *mecanismul β-eliminării*, în care sînt notate prin litere (a—d) diferitele etape ale procesului *(figura 1.77)*

La baza β-eliminării stă un mecanism de dublă inducţie electrofilă *(J. Montrevil şi colab., 1967)* care se aplică legăturilor glicozidice cu OH plasat în β faţă de carbonil; dacă există o funcţie carboxilică aceasta trebuie să fie conjugată. Schematizînd legătura O glicozidică (a), în primul stadiu se consideră polarizarea sa ce conferă Cβ o încărcare pozitivă parţială permanentă (b). În mediu alcalin, are loc enolizarea grupării carbonilice; aceste două etape duc la slăbirea legăturii Cα faţă de carbonil şi eliberîndu-se uşor un proton se ajunge la un carbanion (c), care se stabilizează prin transferul unui e^- de la funcţia enol şi a dubletului liber al Cα către Cβ (d) conducînd la ruperea legăturii O-glicozidice, cu formarea glicozilatului şi dehidroagliconului. Dacă în această legătură a fost angajat ca aglicon serina, prin β-eliminare se va produce dehidroalanina; din treonină, acidul α-amino-crotonic.

Pentru ilustrarea structurilor posibile ale complecşilor cu greutate moleculară mare s-au propus diferite formulări *(figura 1.78)*.

Ipoteza lui *Partridge (1961)* consideră că pe un lanţ proteic sînt grefate, la o extremitate, un polizaharid bogat în glucozamină şi galactoză şi că pe toată lungimea sa se repartizează aproximativ 20 resturi de condroitinsulfaţi.

Scanned with OKEN Scanner

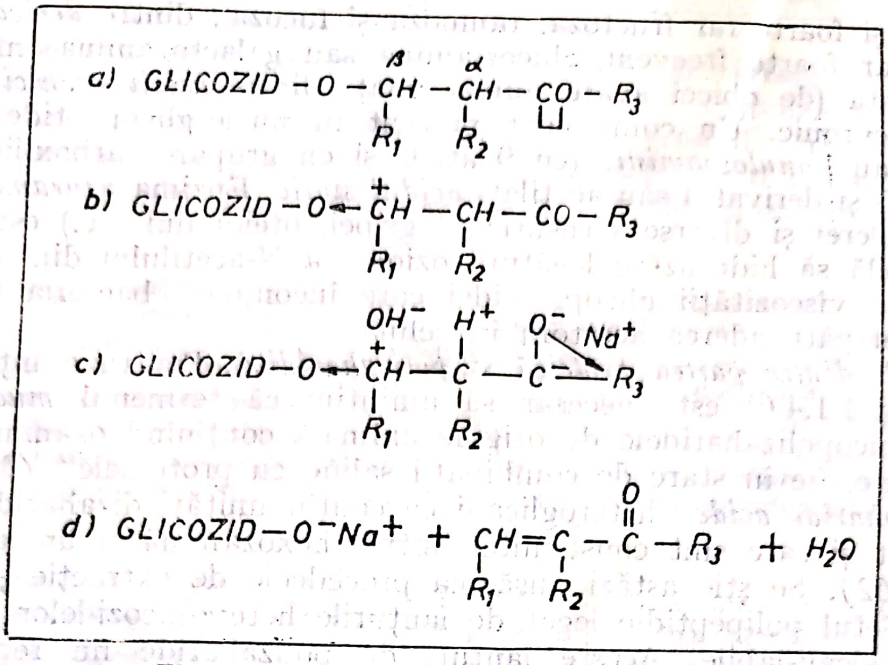


Fig. 1.77. Schema mecanismului β-eliminării

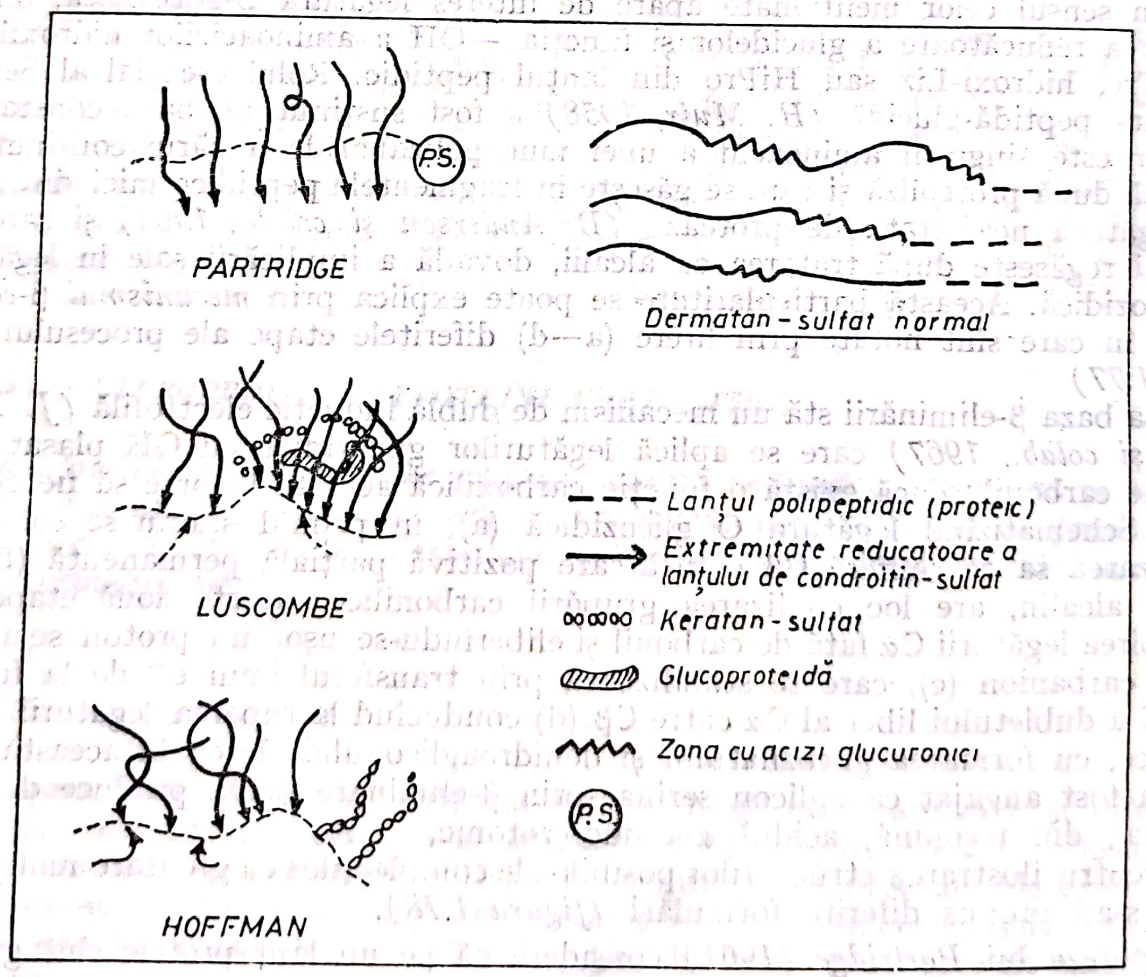


Fig. 1.78. Schema structurilor posibile ale complecșilor glucoproteidelor (după J. C. Jardillier, J. Agneray, R. Havez, 1970).

Scanned with OKEN Scanner

Această structură presupune că extremităţile reducătoare ale condroitinsulfaţilor sînt libere, ceea ce nu corespunde realităţii.

Structura în reţea a lui *Luscombe* admite un lanţ proteic cu gr. mol. 120.000—140.000 pe care se grefează aproximativ 20 lanţuri de condroitinsulfaţi, prin legături O-glicozidice cu serina. Aceste lanţuri ar îngloba keratansulfaţii şi o glicoproteină; condroitinsulfatul reprezintă 85% din partea glucidică a complexului total (cu gr. mol. de 2.—3.000.000), orientat spre exterior.

Hoffman (1967) pledează pentru un schelet glicoproteic unic, pe care se grefează condroitinsulfaţii într-o regiune bogată în Ser şi Gli, şi keratansulfaţii într-o regiune bogată în Glu şi Pro. Condroitinsulfaţii s-ar grefa mai ales pe ramificaţiile scurte ale lanţului proteic.

Structura părţii proteice pare a nu avea o organizare secundară, fiind lipsită de legăturile disulfidice şi de legăturile saline intermoleculare *(E. Eyring, Yang Ten Tsi, 1968)*.

Clasificarea şi descrierea glicoproteidelor. Glicoproteidele se pot împărţi în două grupe *(Blix)*:

Glicoproteide acide, în care gruparea prostetică este reprezentată prin mucopolizaharidele acide: acidul mucoitinsulfuric în mucoproteide; acidul condroitinsulfuric în condroproteide; acidul hialuronic în hialoproteine. Ele predomină în ţesutul conjunctiv şi se caracterizează printr-o vîscozitate mare şi precipitarea cu acizi sau la cald.

Glicoproteide neutre, răspîndite în organism (plasma sanguină, tractul gastrointestinal, urină); aici aparţin şi unii hormoni.

Descrierea glicoproteidelor după ţesuturi şi organe.

Glicoproteidele ţesutului conjunctiv cuprind, în special, acidul hialuronic, acizii condroitinsulfurici şi keratosulfurici, şi se obţin sub formă de complexe stabile, cu legături „saline".

Acidul hialuronic este prezent în umoarea apoasă, cordonul ombilical, lichidul sinovial şi pleural, în tumorile mezenchimatoase, streptococii hemolitici din grupul A, C etc. Complexul acid hialuronic-proteină se obţine prin precipitare cu acid acetic (pH 4); izolat din lichidul sinovial este omogen la ultracentrifugare şi conţine 27% proteine de tip serumalbumine. Complexul disociază cu acetat de Na la pH 9 şi poate fi eliberat de proteine. Acidul hialuronic ca atare este alcătuit din încatenarea unui mare număr de molecule de acid hialobiuronic *(a se vedea 1.1.4.6.)* pînă la dimensiuni de 4 800—10 000 Å şi gr. mol. 200 000—1 000 000; complexul cu proteina are gr. mol. în jur de 8 000 000 *(Ogston, Stanier, 1950)*.

Importanţa biologică a acidului hialuronic şi a complecşilor săi cu proteinele este legată de rolul lor de „lubrefiant" sau „matrice gelatinoasă" ce protejează celulele. Acest rol apare în strînsă dependenţă de hialuronidază, care depolimerizează acidul hialuronic şi scade astfel vîscozitatea şi protecţia realizată de „barierele" hialuronice.

Acizii condroitinsulfurici, sub forma de complecşi cu proteinele, au fost izolaţi din cartilaje, tendoane, piele, cordon ombilical şi au fost denumiţi după originea lor: condromucoid, oseomucoid, tendomucoid, chorionmucoid,; greutăţile lor moleculare variază mult după metoda de extracţie, situîndu-se între 14 000 şi 260 000. După structura lor se denumesc A, B, C. Tipul A reprezintă constituentul principal al cartilajelor; tipul B lipseşte din cartilaje dar se găseşte în piele, tendoane, aortă. În privinţa legăturii cu proteinele, tipul A manifestă legături stabile, în timp ce tipurile B şi C nu se leagă stabil.

Deşi rolul lor biologic nu este complet elucidat, se consideră, totuşi, importanţi ca „elemente structurale" ale ţesuturilor şi prin participarea în procesele fiziologice, de exemplu, calcefiere, controlul şi repartizarea apei şi electroliţilor în diferite lichide, inclusiv în cele oculare etc.

Glicoproteidele din mucoase. Celulele cavităţii bucale, a tractului gastrointestinal, uro-genital etc. produc o secreţie filantă-vîscoasă (mucus) a cărui aspect s-a atribuit unor substanţe numite „mucine". Extinderea studiilor şi asupra altor secreţii din nas, trahee, bronhii, esofag, vezica biliară, trompele uterine etc. a făcut ca termenul de „mucus" să-şi piardă semnificaţia. În prezent se recomandă clasificarea în *mucoproteide*, formate din asocierea acidului mucoitinsulfuric cu proteinele şi *mucoide*, constituite din oze aminate, galactoză, glucoză, fucoză, acid sialic.

În grupul mucoproteidelor apar diferenţe între proprietăţile fizico-chimice şi comportarea faţă de hialuronidază şi unele caractere comune: prezenţa galactozei, fucozei şi hexozaminelor (în proporţii variabile) şi conţinutul ridicat, în partea proteică, a serinei şi treoninei. Mucina secretată de glandele submaxilare conţine 42% glucide (inclusiv acidul sialic) şi 58% acizi aminaţi; cea din uter are 80% glucide (din care 25% acid neuraminic) iar cea stomacală conţine acid mucoitinsulfuric.

Scanned with OKEN Scanner

După natura lor chimică se pot grupa în două categorii:

— *Glicoproteide cu conținut ridicat de fucoză* (sub formă de mucopolizaharid) denumite și *fucomucine*, din tractul gastrointestinal. Tot aici se pot încadra și substanțele care caracterizează grupele sanguine și din unele chiste ovariene (chiste pseudomucinoase);

— *Sialomucine*, foarte vîscoase, cu conținut ridicat în acid sialic, prezente în salivă (20—25%), în mucusul cervixului uterin (4—12%).

Glicoproteide urinare. În urinele deproteinizate în prealabil cu acid sulfosalicilic se pot evidenția mucoproteide și acidul sialic (prin metoda colorimetrică *Dische* cu difenilamină). Din urina normală, prin fracționare alcoolică și precipitare la *pH* = 3, s-a izolat *mucoidul lui Tabs și Horsfall*, cu gr. mol. de aproximativ 7 000 000, ce conține acid sialic (9%) și galactoză, manoză, fucoză, hexozamine (în raport molecular de 6 : 3 : 1 : 8), cu proprietăți biologice, fiind un inhibitor puternic al hemaglutinării produse de virusuri.

O altă glicoproteidă este *mucoidul urinar* responsabil de „fenomenul de obstacol al lui Donaggio" (1931), caracteristic stării de oboseală. Reacția Donaggio constă în tratarea urinei cu tionină și molibdat de amoniu, cînd apare, după o anumită perioadă de timp, un precipitat violet înconjurat de un lichid incolor; la persoanele în stare de oboseală fizică nu se produce culoarea. Substanța responsabilă de acest „fenomen de obstacol" denumită *mucoproteida lui Donaggio* a fost obținută din urină prin acidifiere cu acid acetic, fierbere, filtrare, dializă și precipitare cu alcool la rece și are următoarea compoziție: Gli (14,2%),Glu (14%), Asp (11%), Val (9.6%), Ala (7,3%), Ser (7,3%), Tre (6,8%), Pro (5,9%), Val (5,1%) și glucide: galactoză, glucoză, manoză, fucoză, hexozamine, în raport molecular de: 10 : 2 : 7 : 7 : 11.

Glicoproteidele din lapte. Laptele mamiferelor conține diferite tipuri de glicoproteide; din laptele de femeie s-a obținut *ginolactomucoidul*, cu 10% N, 19,5% hexoze și 10% hexozamine.

Glicoproteidele din ou. Din albușul de ou s-au obținut o serie de glicoproteide: *ovalbumina*, cu o parte de natură glucidică ce nu poate fi separată de partea proteică prin metodele uzuale. *Ovomucoidul*, omogen la ultracentrifugare dar eterogen la electroforeză, are gr. mol. 27—29 000 (cu 22—26% glucide) este termostabil și manifestă o activitate antitripsină. *Ovomucina* sau *ovomucoidul* β este puțin solubil în apă, de aceea apare sub forma unei substanțe foarte vîscoase atunci cînd se diluează

TABELUL 1.32

Exemple de glicoproteide, după clasificarea biologică (R. G. Spiro, 1970)

Grupa	Exemple
Plasmă	Fetuina, α_1-glicoproteida acidă, transferina, ceruloplasmina, haptoglobina, α_2-macroglobulina, Barium α_2-glicoproteida, fibrinogenul, β-lipoproteina, globulina de legare a tiroxinei, globulina de legare a corticosteroizilor
Imunoglobuline	IgG, IgA, IgM
Urină	Glicoproteidele Tabs și Horsfall
Hormoni	Gonadotropina corionică, hormonul foliculo-stimulator (ICSH), hormonul tiroidstimulator, thiroglobina
Enzime	Ribonucleaza pancreatică, dezoxiribonucleaza, takaamilaza, glucozooxidaza fungică, transpeptidaza γ-glutamil renală, β-glucuronidaza hepatică, N-acetilglucosamidinaza, colinesteraza serică, atropinesteraza, peroxidaza din hrean, glucoamilaza fungică, cloroperoxidaza, pepsina și pepsinogenul, invertaza din drojdie
Albuș de ou	Ovalbumina, ovomucoid, avidina, ovotransferina
Mucine	Glicoproteidele din glandele submaxilare, din chisturile ovariene, sulfatate gastrice, colonice
Țesuturi conjunctive	Proteoglicani, colageni, glicoproteidele aortei, glicoproteidele acide ale osului, proteinele keratan-sulfatate
Membrane extracelulare	Membrana bazală glomerulară, pereții celulari vegetali, pereții celulari ai drojdiei
Membrane celulare	Membrane „plasmatice", membrane intracelulare, membranele plăcuțelor, pigmenți vizuali, membranele celulelor de E. coli
Fitohemaglutinine	Din boabele de soia, din cartofi, din ciuperci

Scanned with OKEN Scanner

mult albuşul de ou cu apă. Are gr. mol. minimă de 7 600 000, prezintă heterogenitate la ultracentrifugare şi efecte de inhibiţie a hemaglutinării (după *M. Javillier şi colab. 1959*).

Tot din grupa glicoproteidelor fac parte „substanţele specifice grupelor sanguine", glicoproteidele din plasma sanguină, mucoproteidele bacteriene, unele enzime (enterochinaza cu 30% glucide, colinesteraza etc.), hormonii glicoproteici etc. *(Tabelul 1.32)*

1.3.5.2.2. FOSFOPROTEIDELE

Partea prostetică a acestui grup de heteroproteide este *acidul fosforic*, legat de grupările —OH ale unor aminoacizi (Ser, Tre etc.). Din această clasă fac parte proteine de mare interes biologic: enzimatic, structural, alimentar.

Fosfoproteinele din lapte. Caseina este principalul constituent proteic al laptelui, reprezentînd aproximativ 80% din proteinele totale ale laptelui de vacă şi 45% din ale laptelui de femeie.

Caseina se găseşte în lapte sub formă de *caseinogen*, care trece în cazeină prin acidulare. Pentru preparare este suficientă, în principiu, acidularea laptelui la pH 4,6 (pH_i al caseinei); se obişnuieşte precipitarea cu HCl 0,05 N şi spălarea precipitatului cu apă şi alcool de concentraţii crescînde (66—99%). De asemenea, se poate izola cu ajutorul labfermentului (chimozina), enzimă ce se găseşte în stomacul unor animale (de exemplu, viţel). Caseina brută este neomogenă; prin simpla diferenţă a solubilităţii în apă se pot obţine trei fracţiuni: β, γ şi precipitatul C.

Compoziţia caseinelor variază după specie, metoda de lucru, fracţiunea analizată etc., dar toate au un conţinut mediu de 15% N, pînă la 1% P şi 0,6—1,2% S. Ele conţin toţi aminoacizii importanţi pentru organism: Glu (22%), Pro (11%), Lis (8,2%), Tir (6,3%), Met (2,8%), Trp (1,2%), calitatea şi proporţia lor fiind optimă pentru utilizarea de către organismul uman. Conţinutul în oze şi derivaţi glucidici este mai ridicat în laptele de femeie faţă de cel de vacă (cifrele în paranteză) şi anume: hexoze 1,98% (0,23%), hexozamine 1,32% (0,19%), acid sialic 0,75% (0,45%).

Acidul fosforic se găseşte în majoritate esterificat cu —OH din serină *(Posternak, 1927)* şi mai puţin cu treonina *(de Verdier, 1935)*. În cursul hidrolizei enzimatice a caseinei se pot izola o serie de *peptone fosforilate*, denumite *caseotirine*, bogate în acid fosforic (2—7%), Ser (12—14%) şi Glu (20—27%); după îndepărtarea acidului fosforic cu fosfoesteraze, ele pot fi hidrolizate în continuare de către enzimele proteolitice. Acidul P—Ser—Glu, obţinut în cursul hidrolizei, nu este atacat de dipeptidaza care scindează dipeptida Ser—Glu, de unde s-a ajuns la părerea că acidul fosforic protejează legăturile peptidice *(P. A. Levene, D. W. Hill, 1933)*.

Moleculele de cazeină sînt alcătuite din numeroase lanţuri peptidice reunite între ele probabil prin grupările ε—NH_2 ale Liz, deoarece 2/3 din numărul acestora nu reacţionează cu F—DNB (dovadă că nu sînt „libere"); de asemenea un rol revine punţilor diesterice fosforice şi pirofosforice interlanţuri *(G. E. Perlmann, 1954)*.

Fosfoproteidele din gălbenuşul de ou sînt *vitelina* (1% P), *vitelenina* (0,28%P), *fosfovitina* (9,7% P) şi *livetina* (0,05% P). Primele două apar în cenapse cu fosfatidele sub formă de *lipovitelină* (1,5% P) şi *lipovitelenină* (1,7% P).

Pentru obţinerea acestor produşi se poate pleca de la gălbenuşul de ou, diluat cu 2 volume de apă, supus ultracentrifugării. Sedimentul se extrage cu eter, se dizolvă în NaCl 10% şi se precipită prin dializă, obţinîndu-se lipovitelina; din soluţia iniţială tratată cu eter se obţin 3 straturi; cel mijlociu dizolvat în NaCl 10% saturat cu eter şi supus dializei dă precipitatul de lipovitelenină.

Fosfoproteidele astfel izolate, deşi sînt omogene în electroforeză, nu par a fi, totuşi, substanţe bine individualizate. Similar caseinei, sînt bogate în aminoacizi valoroşi pentru organism; în cursul hidrolizei apar diferite fosfopeptide: α_1, β_1, β_2, γ — ovotirinele, bogate în fosfor (8—14% P). Dintre acestea, β_2-ovotirina ar fi identică cu *acidul vitelinic* cu 9—10% P şi 0,6% Fe.

Fosfovitina reprezintă 60—70% din fosfoproteidele gălbenuşului de ou şi conţine 9,7% P pentru o gr. mol. de 21 000. Este de remarcat că numărul radicalilor fosforici este identic cu numărul moleculelor de serină (care reprezintă 33% din totalul aminoacizilor), sugerînd astfel angajarea în totalitate a acidului fosforic sub formă de legături monoesterice cu serina.

Fosfoproteidele vegetale extrase din seminţe, considerate în literatura mai veche ca fiind similare celor animale, sînt în realitate proteine impurificate cu fosfaţi sau cu fosfoaminolipide, care se separă greu de partea proteică *(C. Bodea şi colab., 1964)*.

Hidrolizate de fosfoproteide. Prin hidroliza caseinei cu HCl, neutralizare cu Na_2CO_3 şi îndepărtarea NaCl formate, se obţin *hidrolizate (acide) de cazeină*, care, pe baza conţinutului bogat în aminoacizi sînt utilizate ca medii de cultură şi în terapie.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.5.2.3. LIPOPROTEIDE

În membranele celulare, mitocondrii, plasma sanguină, gălbenușul de ou etc. există complecși lipoproteici formați prin unirea celor două componente sub formă de *cenapse lipoproteice*. Ele au fost inițial izolate din serul sanguin și studiate în legătură cu rolul lor de a solubiliza și transporta lipidele *(Machboeuf)*.

Se consideră că în structurarea lor, pe lîngă forțele de coeziune *(Van der Waals)* apar și legături ionice între grupările carboxilice libere ale aminoacizilor din lanțul polipeptidic și grupările pozitive ale fosfolipidelor (de exemplu, din colină), precum și între acidul fosforic din fosfatide și grupările aminice libere din proteine; forțele de coeziune ar avea rolul principal în legarea cu proteinele a gliceridelor și sterolilor.

Metodele moderne, electronomicroscopia, ultracentrifugarea, cromatografia, electroforeza preparativă și analitică, au permis aprofundarea cunoștințelor asupra lipoproteidelor. În prezent, ele se clasifică și se caracterizează, în special, pe baza flotației în ultracentrifugare, a migrării electroforetice și a raportului între diferitele lipide și proteine componente. Este de menționat că ele sînt destul de instabile (mai ales β-lipoproteidele) și sînt protejate prin asocierea cu alte proteine, astfel încît nu sînt accesibile extracției cu eter decît după ce în prealabil legăturile au fost labilizate prin alcool sau după hidroliza componentei proteice. *Lipoproteinlipaza*, izolată din diferite țesuturi (de exemplu, din cel adipos) scindează gliceridele din lipoproteide, participînd astfel în mobilizarea și depozitarea lipidelor; diferiți agenți chimici, de exemplu, săpunurile și diverse saponozide pot elibera colesterolul din cenapsele lipoproteice. Avînd în vedere importanța deosebită a lipoproteinelor și semnificația lor fiziopatologică, ele vor fi tratate în detaliu în alte capitole.

1.3.5.2.4. CAROTENOPROTEIDE

Carotenoproteidele au ca grupare prostetică compuși de natură carotenoidă, larg răspîndiți în regnul vegetal și animal.

Din ouăle de *Homarus americanus* s-a izolat *ovoverdina*. Obținerea în stare pură implică precipitarea din soluție apoasă cu sulfat de amoniu la saturare, dizolvarea în apă, adsorbția pe coloană de hidroxid de aluminiu, eluarea cu sulfat de amoniu (40% saturare) și reprecipitări cu sulfat de amoniu. Produsul pur are pH_i în jur de 7 și o culoare verde, stabilă la pH 4—8. Partea prostetică, *astaxantina* se găsește în raport de 1 la 142 față de proteină, separarea lor realizîndu-se prin încălzire moderată în absență de aer. Carotenoproteidele pot avea culori diferite: verzi (homari, ovarul de *Astacus gammarus*), verzi-brune *(Gammarus pulex)*, albastre *(Heterocope saliens)*, violet-roșii *(Aristeus antennatus)*, violet-albastre *(Aristeomorpha foliaceea)*, albastru-negre (carapacea de homar) etc.

În general, se poate considera că legarea carotenilor cu proteinele reprezintă nu numai o formă de transport (caroteno-albumine) ci și forme active, de interes pentru procesele biologice, de exemplu, în procesul vederii *(a se vedea 2.1.2)*.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.6. NUCLEOPROTEIDE. ACIZII NUCLEICI. BAZE PIRIMIDINICE ŞI PURINICE. NUCLEOZIDE. NUCLEOTIDE.

Importanţa deosebită a acizilor nucleici, cele mai mari biomolecule (cu gr. mol. pînă la 10^9) constă în *rolul lor esenţial de înmagazinare a informaţiei genetice şi a transcrierii sale în biosinteza tuturor proteinelor din organisme.*

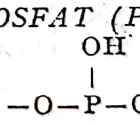
Nucleoproteidele au fost iniţial izolate din „puroiul chirurgical" (de către anatomistul *Friederich Miescher, 1868*). Cercetările ulterioare *(Fr. Miescher, A. Kossel, A. Neumann, J. Picard, P. Altman, H. Steudel, A. Ascoli, O. Hammarsten* etc.) relevă că *„nucleinele"*, denumirea veche, azi înlocuită cu denumirea *„nucleoproteide"*, sînt alcătuite dintr-o parte proteică şi o parte prostetică, *acizii nucleici*, cu conţinut ridicat în acid fosforic, ce le conferă un caracter acid. Acizii nucleici ca atare şi în nucleoproteide sînt universal răspîndiţi sub forma a două tipuri principale: acizii nucleici din regnul animal, *zoonucleici* sau *timonucleici*, notaţi *ADN* sau *DNA*, şi cei din regnul vegetal, *fitonucleici*, *zimonucleici* sau *ribonucleici*, notaţi *ARN* sau *RNA*. Ulterior s-a propus modelul structurii „tetranucleotidice" *(Levene, 1930)* şi s-a stabilit că ambele tipuri de acizi nucleici se găsesc în toate celulele, proporţia lor fiind determinată de raportul nucleu/citoplasmă *(T. Casperson, J. Brachet, 1940)*. Faptul că ADN se găseşte cu predilecţie în nucleu şi ARN în citoplasmă (dar nu în exclusivitate) şi valoarea mai mare a raportului nucleu/citoplasmă în celulele animale explică răspîndirea mai abundentă a ADN la animale şi a ARN la plante, dar concepţiile actuale estompează aceste limite de distribuţie, bazate pe imperfecţiunea tehnicilor de izolare şi caracterizare din trecut.

Compoziţia „elementară" a acizilor nucleici

Hidroliza cu acizi, baze, enzime şi alte metode arată că acizii nucleici conţin trei categorii de componenţi, comuni sau cu diferenţe structurale: *acidul fosforic* (P) comun; *baze purinice: adenina* (A) şi *guanina* (G), comune; *baze pirimidinice*, comune: *citozina* şi diferite: *uracilul* (U) în ARN şi *timina* (T) în ADN; *pentoze*, diferite: *riboza* (Rib) în ARN şi *dezoxiriboza* (dR) în ADN *(tabelul 1.33)*.

TABELUL 1.33

Componenţi comuni şi diferiţi între acizii ribonucleici (ARN sau RNA) şi dezoxiribonucleici (ADN sau DNA)

TIP DE COMPONENŢI	*ADN*	*COMUNI*	*ARN*
		FOSFAT (P) 	
BAZE PURINICE:		*ADENINA (A)* (6-aminopurina) *GUANINA (G)* (2-amino-6-oxipurina)	
BAZE PIRIMIDINICE:	*TIMINA (T)* (2,6-dioxi-5-metil-pirimidina)	*CITOZINA (C)* (2-oxi-6-amino-pirimidina)	*URACIL (U)* (2,6-dioxi-pirimidina)
PENTOZE:	*DEZOXIRIBOZA (DR)*		*RIBOZA (Rib)*

În esență, deci, fiecare acid nucleic este alcătuit dintr-un număr foarte mare de nucleotide, fiecare din acestea fiind formate din acid fosforic, o pentoză (Rib sau DR) și cîte o bază azotată: A, G sau C (comune) și U sau T (diferite); din unii acizi nucleici s-au izolat încă un număr de aproximativ 30 baze azotate diferite, în cantități mici, denumite baze „minore".

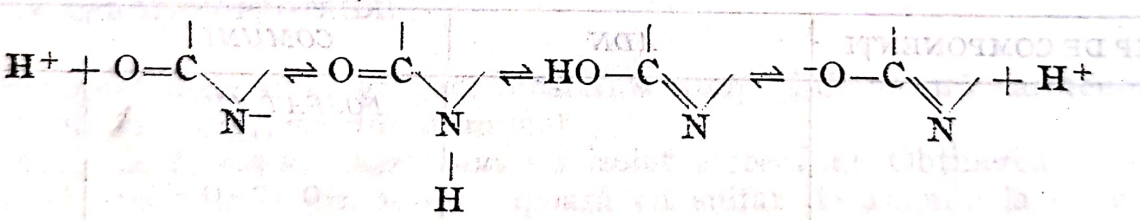
1.3.6.1. *BAZE PIRIMIDINICE ȘI PURINICE*

Acești heterocicli, datorită atomilor de N (cu cîte doi electroni neparticipanți) manifestă caracter bazic. Înlocuirea H cu —OH sau $-NH_2$ (ca în bazele din acizii nucleici) le reduce mult solubilitatea în apă, le crește p.t. și le conferă stări tautomere, datorită deplasării dublei legături C=C respectiv C=N spre atomul de O în cazul „ceto-enol"; similar apare și „amino-imino":

$$-\underset{\|}{C}-OH \rightleftharpoons -\underset{|}{C}=O \;;\quad -\underset{\|}{C}-NH_2 \rightleftharpoons -\underset{|}{C}=NH$$

enol (lactim) *ceto* (lactam) *amino* *imino*

Formele tautomere sînt diferit ionizate, de exemplu în cazul bazelor cu O, ionizarea formei lactam afectează un N nuclear din vecinătatea C, în timp ce ionizarea funcției lactim interesează enolul și explică faptul că derivații aminați au caracter de cationi, dînd săruri cu anionii și că derivații enolici se comportă ca acizi, dînd săruri cu cationii:



ionizarea formei lactam *forma lactam* *forma lactim* *ionizarea formei lactim*

În cazul în care în aceeași moleculă coexistă două grupări cu oxigen (U) sau o grupare cu oxigen și una cu amină (C, T, G) apar, pe lîngă formele menționate și compuși care pot prezenta ambele forme de tautomerie (lactam și lactim).

Repartizarea energiei în moleculă favorizează, în mediile sub pH 9, deci în sistemele biologice, formele „ceto" și „amino".

O proprietate importantă este absorbția în U.V. la 260 nm, care permite recunoașterea și dozarea lor spectrofotometrică (vezi cap. 1.3.6.5.6.1.)

1.3.6.1.1. BAZELE PIRIMIDINICE

Bazele pirimidinice derivă (teoretic) de la nucleul pirimidinic (1,3- sau meta-diazina) *(A. Pinner, 1885)*, de unde îi provine şi numele *PIRI*dină + a*MIDINA*. Formulele se pot scrie în două feluri: A şi B, dar este preferată forma A deoarece cercetările cu raze X au arătat coplanaritatea atomilor ciclului, cu formarea unui hexagon aproape regulat; de interes este şi tautomeria lor *(figura 1.79)*

Uracilul (2,4-dioxipirimidina) se găseşte în ARN (izolat de *Ascoli, 1900*, din ARN din drojdie), în nucleotide, cu rol de activare a substratelor, de exemplu, UDP-oze şi derivaţii acestora şi este singura bază pirimidinică ce apare în stare liberă (în secala cornută). Recent au fost identificate o serie de baze „minore", de exemplu, 5—OH—U din ADN unor viruşi; dihidro—U, 2—tio—U, 4—tio—U, din unii t-ARN.

Timina, 5-metil—U (2,4-dioxi-5-metil-pirimidina) a fost iniţial izolată din ADN din timus (de unde şi denumirea). Este considerată ca bază pirimidinică a ADN, deşi a fost izolată şi din unele tipuri de ARN, dar numai în cantităţi mici.

Citozina (2-oxi-4-amino-pirimidina) *(Kossel, 1894)* se găseşte atît în ADN cît şi în ARN (singurul derivat pirimidinic comun), în unele nucleotide (de exemplu, citidinfosfaţi), cu rol important în biosinteza fosfolipidelor. Citozina se transformă în uracil prin dezaminare oxidativă (cu acid azotos sau enzimatic). Ca baze „minore" s-au găsit în unii acizi nucleici 5-metil-C şi 5-hidroxi-metil-C.

Acidul orotic (2,4-dioxi-6-carboxil-pirimidina) nu intră în structura acizilor nucleici, dar apare ca precursor important în biosinteza pirimidinelor.

Sintetic s-au obţinut: 2-tio-U şi 5-metil-tio-U (antitiroidieni, guşogeni), ditio-U, 5-OH-U, 5-NH_2-U, 5-NO_2-U şi derivaţii *5*-halogenaţi: 5-Br-U, 5-I-U, 5-Cl-U, 5-F-U. Unii dintre aceştia se comportă ca „analogi" ai bazelor pirimidinice, inhibitori ai biosintezei acizilor nucleici, utilizaţi în cercetări experimentale şi în terapie (de exemplu, 5-F-U, pentru tratamentul paleativ al unor afecţiuni neoplazice: carcinomul de sîn, al colonului, rectului).

1.3.6.1.2. BAZELE PURINICE

Heterociclul purinic a fost identificat în acidul uric (*Medicus*, de unde şi denumirea „purrum uricum") şi poate fi considerat ca fiind (teoretic) alcătuit dintr-un nucleu pirimidinic condensat cu unul imidazolic; la fel cu bazele pirimidinice prezintă tautomeria „ceto-enol" şi respectiv „amino-imino" *(figura 1.80)*

Adenina (6-amino-purina), izolată din pancreas şi apoi din drojdie (*Kossel*, 1885) se găseşte în ambii acizi nucleici, în nucleotidele mono-, di- şi trifosforilate şi în structura unor coenzime: coenzima acetilantă (CoA), în nicotinadenin-nucleotide (NAD, NADP), în S-adenozil-metionină etc., compuşi de mare importanţă biologică. Din unii ARN s-au obţinut ca baze „minore" N^1-Metil-A, N^6-metil-A, N^6-dimetil-A etc.

Prin dezaminare oxidativă (cu acid azotos sau enzimatic) adenina se transformă în *hipoxantină* (6-oxi-purina), izolată iniţial din splină (1850). Ea nu intră în structura acizilor nucleici, dar apare în nucleotide (acidul inozic).

Guanina (2-amino-6-oxi-purina) a fost izolată iniţial din excrementele unor păsări, „guano" *(Magnus, 1844)*, apoi, din ambii acizi nucleici *(Kossel, 1883)* şi mai tîrziu din nucleotidele de tipul mono-, di- şi tri-fosfo-guanină, cu rol metabolic important. Bazele „minore" sînt similare celor menţionate la adenină.

Filiaţia metabolică a catabolismului bazelor purinice este, schematic, următoarea:

Adenină → *Hipoxantina* ↘
Guanină ——————→ *Xantina* → *Acid uric*

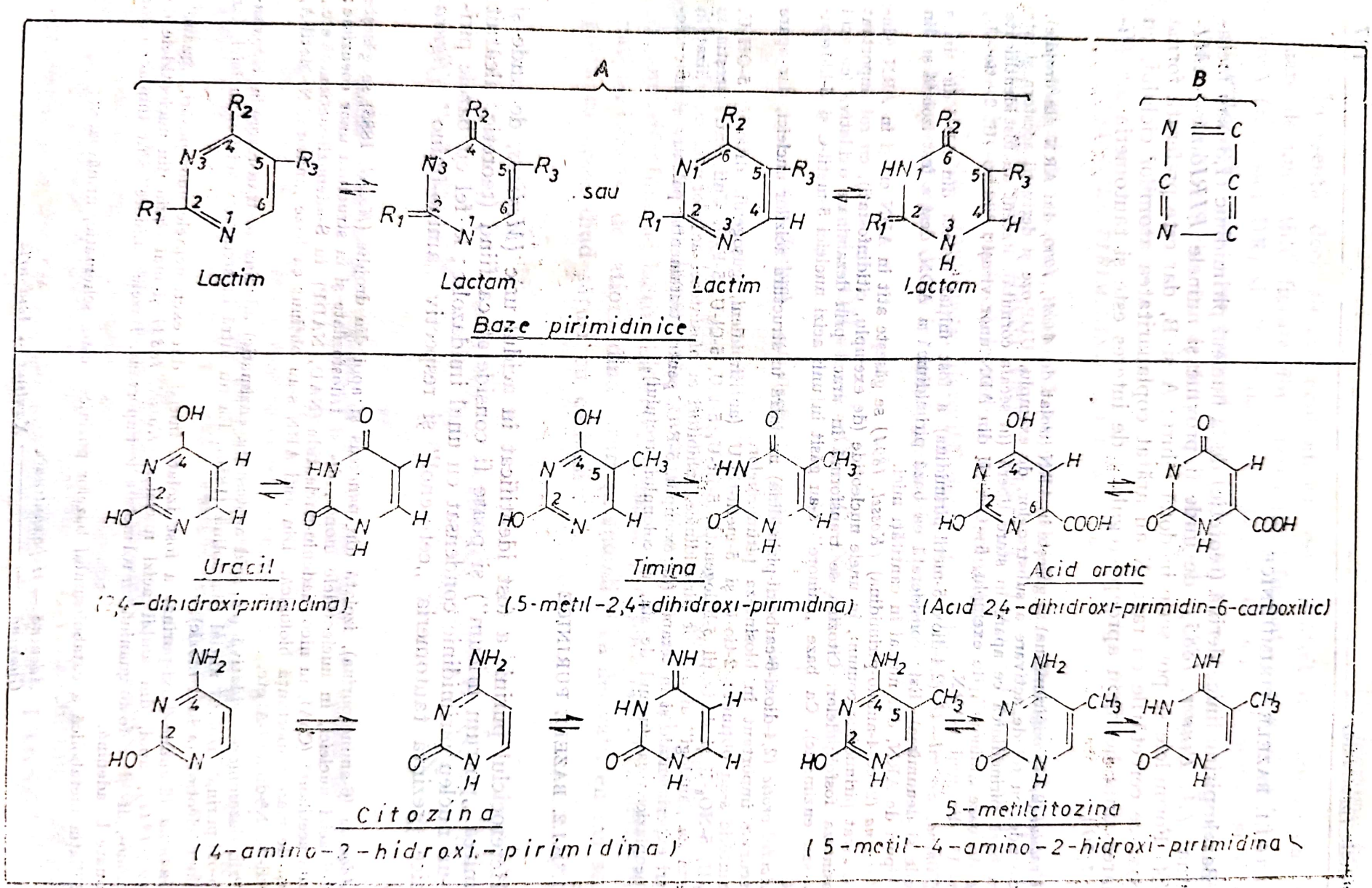


Fig. 1.79. Formulele şi tautomeria unor baze pirimidinice naturale

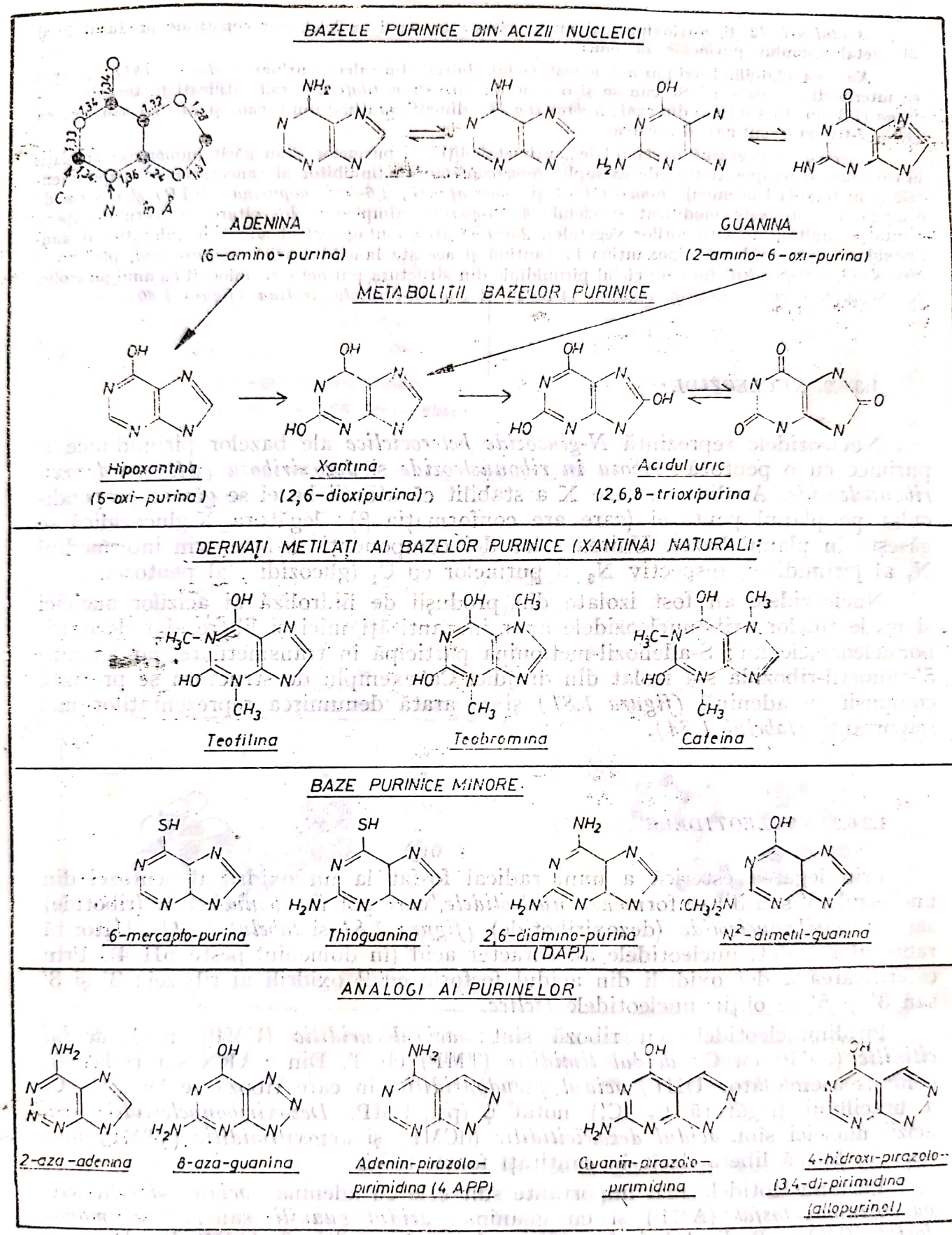


Fig. 1.80. Structura bazelor purinice naturale, a metaboliților lor, a bazelor purinice minore și a unor analogi ai purinelor (în formule nu sînt notați hidrogenii).

Acidul uric (2, 6, 8-trioxipurina) nu se găseşte în acizii nucleici, dar constituie produsul final al metabolismului purinelor la om.

Xantina (2,6-dihidroxi-purina) a fost izolată iniţial din calculii urinari *(Marcet, 1817)* şi apoi ca intermediar metabolic. Se cunosc şi o serie de *derivaţi metilaţi* naturali, utilizaţi în terapie: *teofilina* (1,3-dimetil-xantina) din ceai; *teobromina* (3,7-dimetil-xantina) din cacao, şi *cafeina* sau *cofeina* (1, 3, 7-trimetil-xantina), din cafea.

O serie de *analogi sintetici*, cu rol de „antimetaboliţi" ai purinelor şi-au găsit numeroase aplicaţii în cercetare şi terapie. Astfel, de exemplu, *6-mercaptopurina* (inhibitor al cancerogenezei experimentale şi în terapia leucemiei); *6-mercapto-A* şi *6-mercapto-G*; *2,6-diaminopurina (DAP)* şi o serie de compuşi în care este modificat şi ciclul: *8-aza-guanina* (împiedică dezvoltarea cancerului experimental şi multiplicarea tumorilor vegetale), *2-aza-adenina* (antagonist al adeninei, inhibitor al xantinoxidazei care oxidează hipoxantina la xantină şi aceasta la acidul uric), *alopurinolul*, precum şi *pirazolo* (3, 4-*d*)-*piridine* (în care ciclul pirimidinic din structura purinei este înlocuit cu unul pirazolic) de exemplu, *adenin-pirazol-pirimidina* (4-APP) şi *guanin-pirazolo-piridina (figura 1.80)*.

1.3.6.2. *NUCLEOZIDE*

Nucleozidele reprezintă *N-glucozide heterociclice* ale bazelor pirimidinice şi purinice cu o pentoză: *riboza în ribonucleozide* şi *dezoxiriboza (dR) în dezoxiribonucleozide*. Analiza cu raze X a stabilit că atomii bazei se găsesc perpendicular pe planul pentozei (care are conformaţia β); legătura N-glucozidică se găseşte în planul bazei. Unirea celor doi componenţi se face prin intermediul N_1 al pirimidinei, respectiv N_9 al purinelor cu C_1 (glicozidic) al pentozei.

Nucleozidele au fost izolate din produşii de hidroliză ai acizilor nucleici şi nucleotidelor; ribonucleozidele apar în cantităţi mici şi libere, dar dezoxiribonucleozidele nu; S-adenozil-metionina participă în transmetilare, iar adenin-5′-tiometil-ribozida s-a izolat din drojdie. Ca exemplu de structură se prezintă compuşii cu adenină *(figura 1.81)* şi se arată denumirea reprezentaţilor mai importanţi *(tabelul 1.34)*.

1.3.6.3. *NUCLEOTIDELE*

Prin legarea esterică a unui radical fosfat la un oxidril al pentozei din nucleozid (5′ sau 3′) se formează *nucleotidele*, care pot fi *ribonucleotide* (ribotide) sau *dezoxiribonucleotide* (dezoxiribotide) *(figura 1.81* şi *tabelul 1.34)*.) Datorită radicalilor fosfat, nucleotidele au caracter acid (în domeniul peste pH 4). Prin esterificarea a doi oxidrili din acidul fosforic cu 2 oxidrili ai ribozei: 2′ şi 3′ sau 3′ şi 5′ se obţin nucleotidele *ciclice*.

Piridinnucleotidele cu riboză sînt: *acidul uridilic* (UMP) cu U; *acidul citidilic* (CMP) cu C; *acidul timidilic* (TMP) cu T. Din t-ARN s-a izolat un compus asemănător UMP, *acidul pseudouridilic*, în care riboza se leagă la C_5 a uracilului (legătură $C_5—C_1'$) notat ψ (psi)-UMP. *Dezoxiribonucleotidele* din acizii nucleici sînt *acidul dezoxicitidilic* (dCMP) şi *dezoxitimidilic* (dTMP) şi nu apar în formă liberă decît în cantităţi foarte mici.

Purinnucleotidele mai importante sînt cele cu adenina: *acidul adenilic* sau *adenozinmonofosfat* (AMP) şi cu guanina: *acidul guanilic* sau *guanozinmonofosfat* (GMP). Radicalul fosfat (P) se leagă în poziţia 3′ (AMP din drojdie), în 5′ (AMP din ţesuturile animale) şi mai rar în poziţia 2′. *Acidul adenilic ciclic,*

Scanned with OKEN Scanner

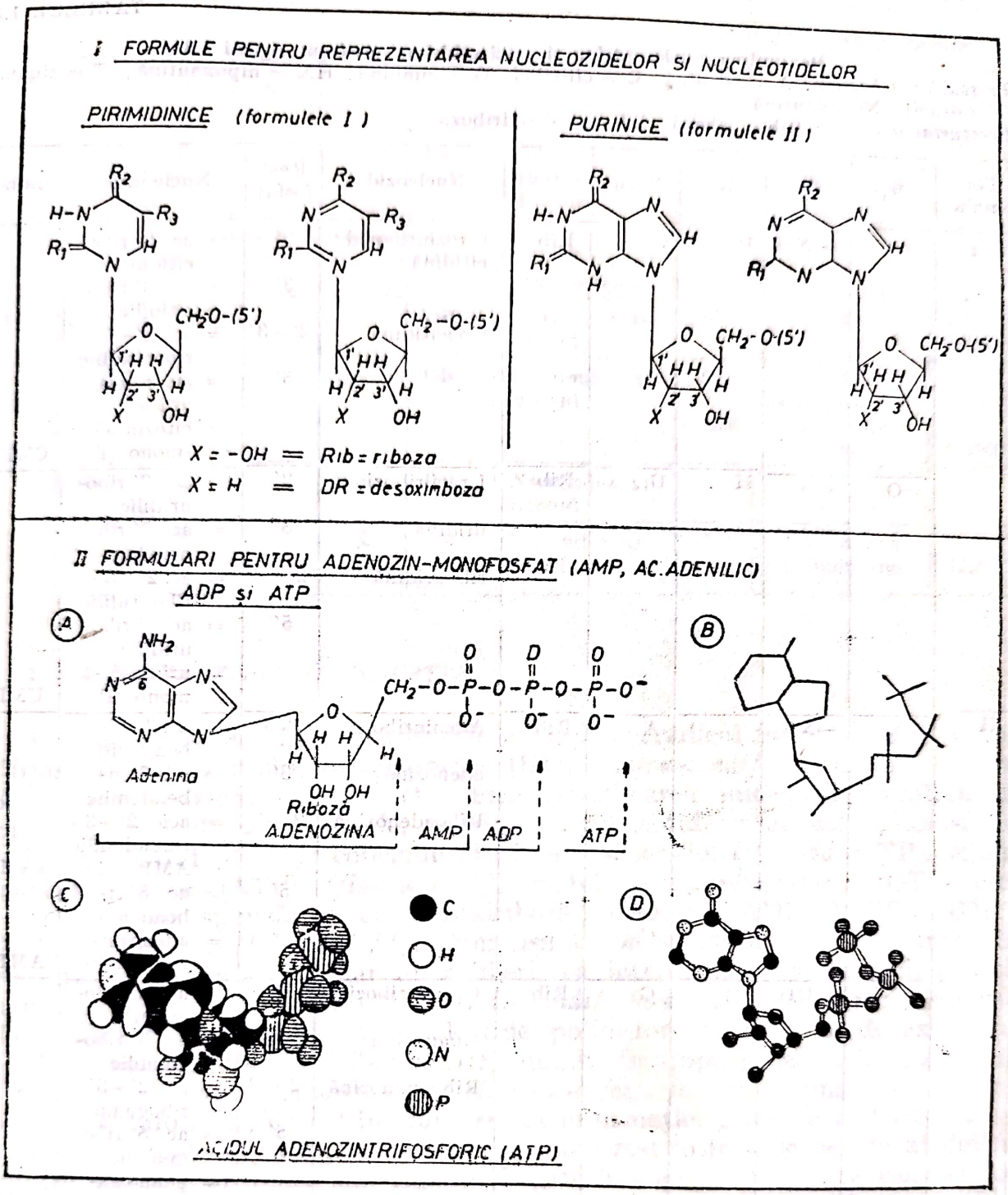


Fig. 1.81. I. *Structurile de bază pentru reprezentarea nucleozidelor și nucleotidelor pirimidinice și purinice, conform tabelului 1.34.* II. *Formulări diferite pentru adenozin-monofosfat (AMP, acid adenilic)* : A. *structura chimică*, B. *modelul „scheletului"*, C. *modelul spațial „compact"*, D. *modelul „bile-bare"*.

3'—5'-adenozinmonofosfatul sau *AMP-ciclic* joacă un rol important ca cel de „al doilea mesager" în activitatea hormonilor (a se vedea cap. *Hormonii*). Cu dezoxiriboza se formează dezoxiribonucleotidele corespunzătoare, componente ale ADN *(tabelul 1.34)*.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.34

Denumirea nucleozidelor şi nucleotidelor, conform figurii 1.81.

Prescurtarea bazelor: A = adenină; C = citozină; G = guanină; HX = hipoxantină; T = timină; U = uracil; X = xantină.

Prescurtarea ozelor: Rib = riboză; DR = 2-deoxiriboza.

Formula	R_1	R_2	R_3	Baza	Oza	Nucleozid	Rest fosfat	Nucleotide	Simbol
I	=O	= NH	H	C	Rib	Citozinribozid; citidină;	2′	= ac. 2′-ribocitidilic	
							3′	= ac. 3′-ribocitidilic	
						ribocitidină	2′—3′	= ac. 2′—3′-ribocitidilic	
							5′	= ac. 5′-ribocitidilic;	
								= citozin-5′-mono (P)	CMP
	=O	=O	H	U	Rib	Uracilribozid;	2′	= ac. 2′-ribouridilic	
						uridină;	3′	= ac. 3′-ribouridilic	
						ribouridină	2′—3′	= ac. 2′—3′-ribouridilic	
							5′	= ac. 5′-ribouridilic	
								= uridin-5′-mono (P)	UMP
II	—H	—NH_2		A	Rib	Adeninribozid;	2′	= ac. 2′-riboadenilic	
						adenozină;	3′	= ac. 3′-riboadenilic	
						Riboadenozină	2′—3′	= acid 2′—3′-riboadenilic	
								= AMP ciclic	cAMP
							5′	= ac. 5′-riboadenilic	
								= adenozin-mono- (P)	AMP
	—NH_2	—OH		G	Rib	Guaninribozid;	2′	= ac. 2′-riboguanilic	
						Guanozină	3′	= ac. 3′-riboguanilic	
						Riboguanozină	2′—3′	= ac. 2′—3′-riboguanilic	
							5′	= ac. 5′-riboguanilic	
								= guanozin-mono- (P)	GMP
	—OH	—OH		X	Rib	Xantinribozid Xantidina			
	—H	—OH		HX	Rib	Hipoxantinribozid Inozina	5′	= acidul inozic;	
								= inozinmono-(P)	IMP
I	=O	=NH	H	C	DR	Citozin-dezoxiribozid; DR-citidina	5′	= ac. 5′-dezoxiribocitidilic	dCMP

TABELUL 1.34 (continuaree)

Formula	R_1	R_2	R_3	Baza	Oza	Nucleozid	Rest fosfat	Nucleotide	Simbol
	=O	=O	$-CH_3$	T	DR	Timindezoxiribozid; timinoza	5′	= ac. 5′-dezoxiribotimidilic = Timidin-5′-mono-P)	TMP
	=O	NH	$-CH_3$		DR	5-metil-citozindezoxiribozid			
II	H	$-NH_2$		A	DR	Adenindezoxiribozid	5′	= ac. 5′-dezoxiribo-adenilic	dAMP
	$-NH_2$	−OH		G	DR	Guanindezoxiribozid	5′ = DR	= ac. 5′-dezoxiriboadenilic = guanozin-5′-mono-(P)	dGMP
	OH	OH		X	DR	Xantindezoxiribozid			
	H	OH		HX	DR	Inozindezoxiribozid	5′	= ac. 5′-dezoxiriboinozinic	dIMP

1.3.6.4. *NUCLEOZID(POLI)FOSFAȚII*

Prin atașarea la diferite nucleotide a unui nou radical fosfat se obțin *nucleoziddifosfații*, de exemplu, *uridindifosfat* (UDP), *adenozindifosfat* (ADP) *(figura 1.81)*, *guanozindifosfat* (GDP) etc. Prin esterificarea nucleoziddifosfaților cu încă o moleculă de acid fosforic, respectiv a nucleotidelor cu acid pirofosforic se obțin nucleozidtrifosfații corespunzători: *acidul uridintrifosforic* (UTP), acidul *adenozintrifosforic* (ATP) *(figura 1.81)*, acidul *guanozintrifosforic* (GTP) etc. și compușii corespunzători cu dezoxiriboză: dAMP, dADP, dATP; dGMP, dGDP, dGTP etc. *(tabelul 1.34)*. Compușii cu *hipoxantină* (care nu intră în structura acizilor nucleici, dar apar liberi, ca intermediari metabolici) poartă denumirea de *acid inozic* (IMP), acid *inozindifosforic* (IDP) și *inozintrifosforic* (ITP). Recent s-au identificat nucleotide polifosforilate rare, ca de exemplu, *acidul guanozin-5′-difosforic-3′-difosforic*, numit impropriu ca acid guanozintetrafosforic și acidul *guanozin-5′-trifosforic-3′-difosforic*, numit impropriu acidul guanozinpentafosforic, cu rol în transcrierea informației genetice la bacterii.

Datorită faptului că legăturile dintre primul rest fosforic și cel de al doilea și dintre acesta și al treilea sînt legături bogate în energie, denumite *macroergice* (eliberează prin hidroliză 7.000—9.000 kcal/legătură) se notează cu ~ (P); asemenea compuși sînt „acumulatoari" de energie, deosebit de importanți pentru celule și organisme.

1.3.6.5. *ACIZII DEZOXIRIBONUCLEICI, ADN, DNA, DRNA*

Macromoleculele de acizi nucleici sînt *polinucleotide* în care legătura se face prin intermediul acidului fosforic de la C(3′) al unei pentoze și C(5′) al celei următoare. Această legătură —3′—5′—3′—5′— încatenează nucleotidele într-o

Scanned with OKEN Scanner

secvență liniară, reprezentînd un fel de „coloană vertebrală" a acizilor nucleici (așa cum legătura peptidică o constituie în proteine). Ceea ce diferențiază un acid nucleic de altul este lungimea lanțului, pentozele, natura și locul pe care-l ocupă bazele, eventualele ramificări. Datorită acestui mod de organizare molecula prezintă o polaritate care condiționează proprietățile fizico-chimice și biologice. Succesiunea (secvența) nucleotidelor determină în ADN *codul genetic* specific, care asigură păstrarea, transmiterea și exprimarea caracterelor ereditare și care, „copiat" de ARN, va determina biosinteza proteinelor specifice celulare. Datorită caracterului acid, acizii nucleici se găsesc adesea legați cu proteine, în special bazice: protamine în sperma peștilor și histone în celelalte celule, dar și cu proteine neutre *(Belozerski)*, constituind *ribo-*, respectiv *dezoxiribonucleoproteide (vezi 1.3.6.7)*.

1.3.6.5.1. IZOLAREA ADN

Extragerea ADN sub formă lipsită de alți componenți, condiție a purității fizico-chimice, are dezavantajul că sacrifică proprietățile biologice care implică legături cu ARN, cu proteine enzimatice și nonenzimatice și cu numeroase micromolecule și aduce riscul alterării structurii sale, prin separarea lanțurilor și desprinderea unor fragmente din subunitățile native. Sensibilitatea moleculei ADN impune evitarea factorilor care ar putea să o degradeze prin „tăiere" sau „forfecare" („shear"-degradarea), dar, stabilirea momentului critic al acestei degradări este dificilă în practică. Un criteriu ar fi încorporarea din $^{18}OH_2$ (din mediu) a izotopului în restul fosforic terminal în timpul ruperii (prin spectrografie de masă), dar rezultatele sînt discutabile din cauza schimbului intens al oxigenului cu apa. O altă problemă dificilă în izolarea ADN este „deproteinizarea".

Metoda care a rezolvat, în mare măsură, aceste dificultăți este metoda *„fenolică"* (*Kirby, 1958* și modificată de *Marmur, 1961*). În principiu, celulele se separă și se lizează cu lizozim sau detergenți. Prin rotirea ușoară a tubului, în prezență de perclorat, se disociază acizii nucleici de proteină și se efectuează deproteinizarea cu cloroform-alcool izoamilic. Pentru decontaminarea de ARN se utilizează ARN-aza sau centrifugarea în CsCl; activitatea ADN-azei din preparat se inhibă prin agenți chelatanți și precipitare cu Na-laurilsulfat iar precipitarea selectivă a ADN se face cu izopropanol. Soluția de fenol protejează ADN față de nucleaze și favorizează solubilizarea proteinelor. Aplicată lizatelor celulare la 55°C, produce deproteinizarea efectivă fără a „forfeca" ADN-ul. Extracția este aproape cantitativă pentru bacteriofagi și 60—85% pentru bacterii. Limitele metodei se datoresc prezenței în fenol a unor peroxizi de fenol (care se îndepărtează în prealabil prin distilare sau cu 8-hidroxichinoleină) și interferării urmelor de fenol cu spectrul de absorbție al ADN în U.V. (care se evită prin extragere cu eter, precipitare cu alcool și dializă sau gel-filtrare).

Pentru virusurile purificate prin sedimentare și centrifugare diferențială se preferă stimularea eliberării naturale și fără alterare a ADN, de exemplu, cu cianură de Cd și incubare cu lizină *(M. Kozloff, M. Lutte, 1957)*, dar preparatul este contaminat cu acizi ribonucleici.

Eșecul extracțiilor din sperma mamiferelor derivă, în principal, din inaccesibilitatea ADN datorită membranelor biologice. Tratarea cu alcool-eter pentru îndepărtarea lipoproteidelor, urmată de extracția salină-citratată (cu adaos de 2-mercaptoetanol) și final tripsinizarea și deproteinizarea conduc la un ADN înalt molecular, cu randament de 90—95%.

1.3.6.5.2. DETERMINAREA GREUTĂȚII MOLECULARE A ADN

Determinarea gr. mol. a ADN întîmpină dificultăți legate de mărimea sa (unii ADN conțin 10^6 perechi de nucleotide și au gr. mol. de ordinul 10^8—10^9, cele mai mari biomolecule), de limitările metodelor fizice (anomaliile metodelor optice, de sedimentare, de vîscozitate) și de posibilitatea obținerii unui standard reproductibil de ADN.

Precauțiile speciale aplicate în izolarea din particulele de fagi T_2 au permis obținerea unui ADN cu gr. mol. de 130 ± 10 milioane (valori stabilite prin metoda cu ^{32}P și analizele chimice). Masa particulei T_2, determinată prin metoda „sedimentare-vîscozitate" fiind de 215 milioane și avînd un conținut de 45—60% ADN, se ajunge la aceeași valoare pentru ADN component (100—130 milioane), considerîndu-se astfel T_2—ADN ca un *standard* real, reproductibil, de ADN.

Scanned with OKEN Scanner

Determinarea greutății moleculare prin metoda combinată „sedimentare-vîscozitate", utilizează ecuația *Mandelkern-Flory* (sau *Sheraga-Mandelkern*), în care parametrul β este funcție de conformația moleculei, cu valoarea $2{,}4 \cdot 10^6$ pentru T_2—ADN și constant pentru ADN dublu helical, aplicînd relația:

$$M = 13\,200/S^0_{20,w}(\mu)^{\frac{1}{2}} / {}^{\frac{3}{2}}$$

unde, M = gr. mol.; $S^0_{20,w}$ = coeficientul de sedimentare din metoda Swedberg la concentrația 0 și corectat pentru apă la 20°C; μ = vîscozitatea intrinsecă la gradientul „shear" de zero (deci pentru un fir integru în care nu a început separarea). Metoda necesită o aparatură care să permită determinarea vîscozității în timp de 0,1 sec^{-1}. Cercetările (1954—1965) au dus la concluzia că pentru ADN liniar dublu-helix, parametrii $S^0_{20,w}$ și μ nu variază independent, ci paralel, crescînd cu gr. mol. a ADN, ceea ce a permis aprecierea gr. mol. prin formule simplificate, cu o singură variabilă: $0{,}445 \log M = 1{,}819 + \log (S^0_{20,w} - 2{,}7)$ sau $0{,}665 \log M = 2{,}863 + \log (\mu + 5)$.

Stabilirea faptului că sarea de Na a ADN prezintă o relație matematică între lungimea ADN (determinată în autografia la microscopul electronic) și gr. mol. din care rezultă că pentru o lungime de 1 Å a ADN corespunde o gr. mol. de 200 daltoni, a permis determinarea gr. mol. prin înmulțirea lungimii ADN (în Å) cu factorul 200. Astfel, de exemplu, pentru T_2— și T_4—ADN, lungimea fiind de 50—70 μ (500 000—700 000 Å), gr. mol. este de 100 000 000—140 000 000 (eroarea ±6%). *(Tabelul 1.35)*

TABELUL 1.35

Caracteristici fizico-chimice ale ADN*

Sursa	Greut. mol.	Lungime (μm)	Nr. perechi de baze pe moleculă
Virusuri			
— *mici*	$2 \times 10^6 - 30 \times 10^6$	(0,5)	3.500—50.000
Polyoma; SV. 40	$3{,}1 \times 10^6$	1,6	4.600
— *mari*	$\approx 130 \times 10^6$	≈50	≈200.000
Fag λ	31×10^6	16	53.000
Fag T 2	122×10^6	63	185.000
Vaccinia	157×10^6	81	240.000
Bacterii (microbi)			
Mycoplasmae	504×10^6	260	760.000
H. influenzae	800×10^6	500	1.300.000
Esch. coli	2.320×10^6	1.200 (1,2 mm)	3.400.000

* O pereche de baze corespunde la o greut. mol. de $0{,}66 \times 10^3$ daltoni; 1 μm de dublu helix corespunde la $2{,}94 \times 10^3$ perechi de baze și respectiv la o greut. mol. de $1{,}94 \times 10^6$ daltoni.

Cercetările efectuate cu metode diferite indică o bună concordanță a rezultatelor, de exemplu, pentru fagul T_7 s-a obținut o gr. mol. de 23—28 milioane prin metoda „sedimentare-vîscozitate", 22—28 prin microscopia electronică și 25 prin metoda difracției. ADN din organismele superioare, de exemplu, din timusul bovin are gr. mol. de 50 mil., iar cel din tumorile mamiferelor, 130 mil.

Se poate reține că întregul *ADN din virusuri* constă dintr-o singură moleculă, care poate fi izolată și manipulată în soluții diluate, fără segmentare; această constatare se poate generaliza, deoarece nu se cunosc excepții. *ADN bacterian (E. coli, H. influenzae)* apare ca o singură structură prin autoradiografie sau la microscopul electronic, dar alte metode dau valori mai mici. Microscopia electronică aplicată lizatelor de celule crude de la animalele superioare pledează pentru fire de ADN de lungimea cromozomilor.

Greutatea moleculară a ADN izolați din țesuturi se situează, în general, între $6-14 \cdot 10^6$, ceea ce pledează pentru faptul că ar fi fragmente ale moleculelor aflate *in situ* și care au suferit acțiunea de scindare enzimatică sau disrupții mecanice în timpul izolării. În ADN din fagul λ, cu lungimea de 23 μ *(Cairns, 1962)*, toate genele sînt aranjate liniar pe un singur șir și numai o singură unitate activă a λ-ADN este infecțioasă *(A. D. Kaiser, 1962)*. Tăiat printr-o „forfecare"

hidrodinamică în două jumătăţi şi fiecare din acestea fiind scindate în două părţi s-au obţinut „sferturi" de moleculă, care puteau să transfere genele s.i. şi m.i. dar nu pe cele m_6, m_5 sau h, obţinîndu-se astfel indicaţii asupra „hărţii genelor" şi a nucleotidelor ce corespund genelor din λ-ADN. Din nucleii bacteriilor s-au obţinut ADN cu gr. mol. $4 \cdot 10^9$, care au fost desfăcuţi în două molecule de 400 μ şi gr. mol. de 10^9 *(J. Cairns)*. Din sperma peştilor s-a izolat, prin plasmoliză şi ultracentrifugare un ADN, cu un coeficient de sedimentare neobişnuit de ridicat şi care nu scade prin tratare cu versen, tripsină sau chimotripsină, dar care poate suferi o „forfecare" („shear-sensibil") *(Davidson, 1960)*. Din elementele reproducătoare s-au obţinut ADN-proteine, în care proteinele le măresc stabilitatea şi flexibilitatea.

Metodele de fracţionare ale ADN, prin cromatografie pe coloană de Ecteola-celuloză, fosfat de Ca, histonă-kiesselgur, serumalbumină metillată-kiesselgur, cromatografia pe hîrtie, electroforeza de zonă pe amidon, prin partiţie în sisteme de faze de polimeri etc. oferă rezultate care depind de diferenţele structurale ale ADN, cu concluzia că gr. mol. a ADN *in situ* este incertă şi că distribuirea moleculei de ADN în preparatele celulare poate fi un artefact, datorit, în primul rînd, degradării prin „forfecare".

Metodele citate au unele particularităţi speciale. Coloanele de albumină metilată-kiesselgur evidenţiază diferenţele compoziţiei moleculare (de exemplu, ADN cu conţinut mai mare de baze „G + C" sînt eluaţi la concentraţii saline mai scăzute); cromatografia permite separarea moleculelor contaminante şi a ADN dezagregat; electroforeza de zonă separă cantităţi mici de ADN nativ de cel denaturat şi de ARN; centrifugarea preparativă (în gradiente de concentraţie diferită) este foarte utilă în fracţionarea ADN marcat cu izotopi sau biologic activ şi oferă astfel date valoroase asupra nivelului la care se situează informaţia genetică specifică în molecula ADN. Această metodă a servit studiului denaturării termice *(a se vedea 1.3.6.5.6.1)*; activitatea biologică pierdută de ADN denaturat poate fi restaurată prin „renaturare" sugerîndu-se că nu este vorba de un fenomen de tipul „tot sau nimic" („is not an all-or-none phenomenon"), ci, din contră, denaturarea şi renaturarea helixului permite obţinerea unei largi variaţii în proporţia refacerii, după condiţiile de lucru.

1.3.6.5.3. COMPOZIŢIA ÎN BAZE (NUCLEOTIDE) A ADN

Importanţa perechii „G+C". Pe cantităţi mici de ADN (1—3 μg), metodele cromatografice şi electroforetice, completate cu centrifugarea în soluţie de CsCl, în care densitatea de flotaţie a ADN este direct proporţională cu concentraţia în „G+C" şi determinările absorbţiei în U.V. la 260—280 nm au adus importante informaţii asupra lanţurilor, eterogenităţii, distribuţiei şi proporţiei moleculare a bazelor şi a eventualei prezenţe a bazelor „minore" *(Schildkraut, Marmur, Doty, 1962)*.

În ADN din bacterii, conţinutul în „G+C" variază între 25—75%; distribuţia este unimodală, pentru un individ deviaţia standard nu depăşeşte 3 moli „G+C" la %. *Halobacterium salinarium*, o curiozitate a naturii, deoarece se dezvoltă optim în soluţie de NaCl 25%, prezintă două benzi de ADN (probabil fiecare dublu-fir): 20% din ADN are 58% „G+C" iar 80% are 67% „G+C". În ADN din unele alge şi diatomee, „G+C" = 37%; în algele verzi: 54—56%; în cele brune: 68—69%; la plantele superioare: 34—48% (adesea cu multă metil-C); la nevertebrate: 35—45%. La vertebrate: 40—44%, cu precizarea că între diferitele ţesuturi de la embrioni sau adulţi sau din neoplasme nu apar diferenţe semnificative. ADN din virusii care induc tumori, de exemplu, polyoma, C+G = 50%. Un ADN neobişnuit, monolanţ, cu gr. mol. de numai 10.000 şi bazele A : G : C : T în raport de 32,2 : 14,9 : 17,0 : 35,7 moli % apare asociat cu lacticodehidrogenaza din drojdie, dar fără a condiţiona activitatea enzimei.

Diferenţele în raportul bazelor din organismele variate şi omogenitatea (constanţa) lor pentru ADN din acelaşi organism pot fi explicate prin evoluţia unui organism comun, pe baza ipotezei că multe perechi de baze pot să sufere schimbări, dar acestea sînt nesemnificative pentru ansamblul moleculei şi că

Scanned with OKEN Scanner

este necesar să se aibă în vedere posibilitatea alterărilor unor perechi de baze, în cursul operațiilor de izolare și prelucrare ale ADN.

Cunoașterea compoziției în baze este de un deosebit interes pentru stabilirea structurii ADN; chiar dacă secvența lor globală nu se cunoaște, proporția bazelor poate fi determinată și poate să indice caracteristicile genetice legate de specie *(tabelul 1.36)*.

Este important că raportul A+C/G+T = 1 (cu excepția unor virusuri mici, cu ADN monolanț), că numărul bazelor purinice este egal cu al bazelor pirimidinice: A+G = C+T, și că raportul G/C și A/T este egal cu 1 *(Chargraff)*, în timp ce raportul A+T/C+G reprezintă o constantă caracteristică speciei. Aceste date pot fi ilustrate sub forma:

1. $\frac{A}{T} = \frac{G}{C} = 1$; 2. A + G = T + C; 3. [A + C (MeC)]: [G + T(U) = 1 : 1;

4. $\frac{A+T}{G+C} > 1$ în ADN de la animale și <1 în ADN de la microorganisme. *(E. Hofmann, 1975)*.

TABELUL 1.36

Conținutul în baze al unor acizi nucleici și variațiile cu specia

I. *Comparație în conținutul de baze al ADN și ARN corespunzători*

Tip	Sursa	Greut. mol.	A	T	U	G	C
ADN	E. coli(x)	$2{,}2\times10^8$	0,25	0,25	—	0,25	0,25
	drojdie		0,31	0,33	—	0,19	0,17
r-ARN	E. coli	$5{,}6\times10^5$	0,25	—	0,21	0,31	0,22
	drojdie		0,26	—	0,26	0,28	0,20
t-ARN	E. coli (total)	$2{,}3\times10^4$	0,21	—	0,21	0,31	0,28
	drojdie (total)		0,19	—	0,24	0,29	0,20
viral	Mozaic tutun	$1{,}7\times10^6$	0,28	—	0,26	0,26	0,20

II. *Raportul cantităților de baze din diferite surse (ADN)*

Specii	Procente (%)				Raport		
	A	G	C	T	A/T	G/C	A+G/C+T
Virusuri							
Adenovirusuri	24,5	25,2	24,8	25,5	0,96	1,02	0,99
Vărsat de vînt	32,2	18,0	17,2	32,6	0,99	1,05	1,01
Bacterii							
E. coli (x)	23,8	26,0	26,4	23,8	1,00	0,98	0,99
B. subtilis	28,9	21,0	21,4	28,7	1,01	0,98	1,00
Plante							
Morcovi	26,7	23,1	23,2	26,9	0,99	1,00	0,99
Arachide	32,1	17,6	18,0	32,2	1,00	0,98	0,99
Animale							
Broască	26,3	23,5	23,8	26,4	1,00	0,99	0,99
Pui (embrion)	28,9	23,7	21,2	26,2	1,10	1,12	1,11
Pui (ficat)	30,3	22,0	19,7	28,0	1,08	1,12	1,10
OM (ficat)	30,3	19,5	19,9	30,3	1,00	0,98	0,99
OM (timus)	29,8	20,2	18,2	31,8	0,94	1,11	1,02

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.36 (continuare)

III. *Variaţiile raporturilor A+T/G+C în moleculele de ADN ale unor organisme, din punct de vedere taxonomic*

Reprezentant	Unitate taxonomică	Raport A+T/G+C
Pseudomonas aeruginosa	bacterie	0,51
Escherichia coli (x)	,,	0,97
Bac. megatherium	,,	1,66
Mycobacterium tuberculosis	,,	0,60
Aspergillus niger	ciupercă	1,00
Sacharomyces cerevisiae	levură	1,80
Scenedesmus quadricauda	algă	0,57
Rabdonema adriatica	diatomee	1,71
Grîu	plantă superioară	1,22
Paracentrotus lividus	arici de mare	1,87
Locusta migratoria	insectă	1,41
Păstrăv	peşte	1,34
Găina domestică	pasăre	1,36
Cal	mamifer	1,33
OM	primat	1,40
Fag T 2	virus	1,84
Fag λ	,,	1,06

* valori după autori diferiţi

1.3.6.5.4. STRUCTURA PRIMARĂ A ADN

Moleculele de ADN posedă o *„coloană vertebrală" constantă*, în care se repetă unităţile: -dR-3′-(P)-dR-5′-; 3′-OH al unei dezoxiriboze (dR) dintr-un nucleotid se uneşte, prin intermediul legăturii fosfat-diester, cu 5′-OH din nucleotidul adiacent. În felul acesta, lanţul ADN posedă o *polaritate:* într-o parte, la capătul 3′-OH apare dR cu 3′-OH liber; în cealaltă parte, 5′-OH din dR este esterificat cu un rest de acid fosforic, care nu se mai leagă cu un alt nucleotid şi constituie capătul 5′-(P). Partea *variabilă* a ADN este reprezentată de secvenţa celor patru tipuri de baze: A, G, C, T, care se repetă într-un număr foarte mare *(figura 1.82).*

Convenţional, lanţurile şi secvenţa bazelor se scriu în direcţia 5′ → 3′, respectiv 5′-(P) în stînga (sau sus) şi 3′-OH în dreapta (sau jos) şi nucleotidele se notează prin simboluri. Astfel, de exemplu, trinucleotidul din ARN, care are la capătul 5′-(P) acidul adenilic (AMP), la mijloc, acidul citidilic (CMP) şi la capătul 3′-OH acidul guanilic, se scrie: pApCpG; pentru trinucleotidul corespunzător din ADN (cu dezoxiriboză în loc de riboză): pdApdCpdG, dar se poate folosi, pentru ambii, notaţia simplificată: ACG. Importanţa respectării convenţiei de scriere a direcţiei secvenţei bazelor (nucleotidelor) rezultă din faptul că grupări de trei nucleotide (numite codoni) determină secvenţa unui aminoacid din lanţul peptidic, care se scrie în direcţia: capătul amino liber → carboxil liber. ACG specifică un aminoacid diferit (Thr) faţă de GCA (Ala).

Scanned with OKEN Scanner

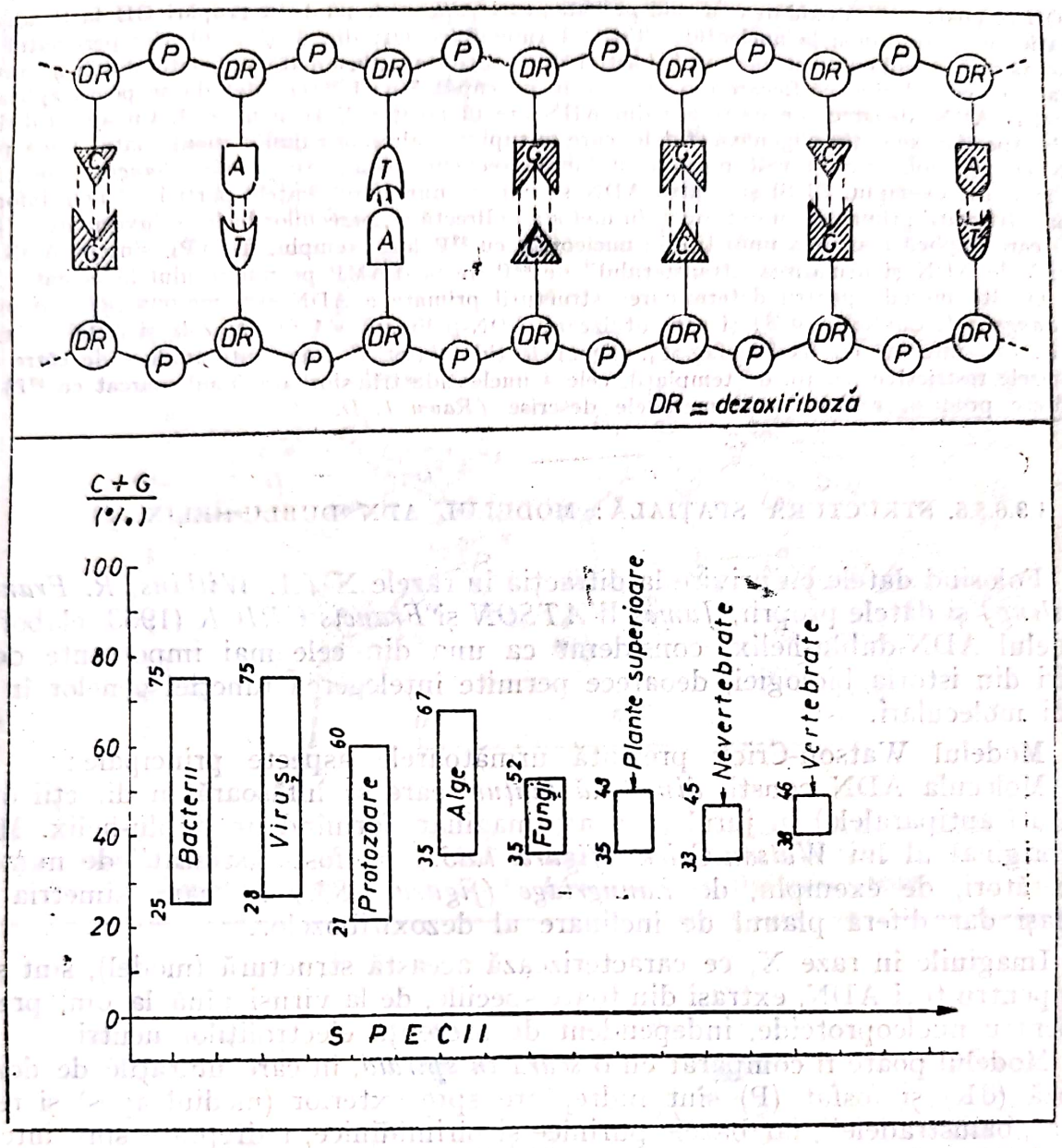


Fig. 1.82. Ilustrarea numărului mare de posibilităţi de secvenţă a nucleotidelor din ADN (sus) şi limitele variaţiilor conţinutului de „G+C" (% din ADN) în raport de specie (evoluţia organismelor)

1.3.6.5.4.1. Determinarea structurii primare a ADN

Determinarea secvenţei nucleotidelor din acizii nucleici se bazează pe principii similare celor aplicate în stabilirea secvenţei aminoacizilor din polipeptide, dar desigur prin metode caracteristice compuşilor specifici. În principiu, se utilizează: *a.* Tehnici de izolare sub formă pură, *b.* Metode de degradare chimice, enzimatice (sau ambele), *c.* Metode de separare şi analiza structurală a fragmentelor. Separarea oligonucleotidelor formate este dificilă din cauza celor 4 baze diferite. Rezultate optime se obţin pe coloane cu DEAE-celuloză şi prin aplicarea ureei în cromatografia pe coloană. Informaţii asupra secvenţei nucleotidelor se obţin prin degradarea *enzimatică*, în care specificitatea enzimei determină punctul de atac şi natura produşilor de hidroliză; *acidă*, care oferă date asupra frecvenţei relative a nucleotidelor pirimidinice singuratice, flancate de ambele părţi de nucleotide purinice; prin formarea hibrizilor ADN etc.

Prima etapă constă în identificarea celor două nucleotide de la capete. Prin hidroliza alcalină, nucleotidul 5′-P-terminal apare sub formă de nucleoziddifosfat (care se identifică); în acest timp restul componenţilor se găsesc sub formă de nucleotide sau nucleozide. Pentru identificarea capătului

3′-OH se poate utiliza oxidarea cu acid periodic, care rupe ozele cu două grupări OH la C adiacenți situație ce apare numai la nucleotidul 3′-OH terminal (cu OH din 3′ și 2′ liberi); periodatul reacționează mol la mol cu acest nucleotid și astfel din cantitatea consumată se poate stabili și numărul de lanțuri, considerînd că fiecare din acestea au un capăt 3′-OH liber. Metoda se poate aplica însă numai la ARN, deoarece dezoxiriboza din ADN are în poziția 2′ H și nu OH. Cu ajutorul diesterazelor specifice se obțin oligonucleotidele, care se supun analizelor chimice menționate. Dacă pentru ARN cu gr. mol. mică a fost posibilă stabilirea secvenței complete *(Holley, Sanger)*, pentru cei mai mari (de exemplu, 23 S) și pentru ADN se cunosc numai secvențele parțiale. Unele informații asupra structurii primare s-au obținut prin metoda indirectă a „perechilor bazelor învecinate" *(Kornberg)* care implică marcarea unui tip de nucleotide cu ^{32}P (de exemplu, d-ATP), sinteza ADN pe o matriță de ADN și urmărirea „transferului" de ^{32}P de la d-AMP pe nucleotidul învecinat.

O altă metodă pentru determinarea structurii primare a ADN este metoda *„plus și minus"* *(F. Sanger, A. Coulson, 1975)* și care utilizează ADN-polimeraza I din *E. coli* și ADN-polimeraza din *E. coli* infectat cu bacteriofag T_4, oligonucleotide sintetice, fragmente produse de către endonucleazele restrictive (cu rol de templați), cele 4 nucleotide trifosforilate (unul marcat cu ^{32}P) și se urmăresc produșii reacției prin metodele descrise *(Rawn J. D., 1983)*.

1.3.6.5.5. STRUCTURA SPAȚIALĂ: MODELUL ADN DUBLU-HELIX

Folosind datele cu privire la difracția în razele X *(A. Wilkins, R. Franklin, Gossling)* și datele proprii, *James WATSON* și *Francis CRICK* (1963) elaborează modelul ADN-dublu-helix, considerat ca una din cele mai importante descoperiri din istoria biologiei, deoarece permite înțelegerea funcției genelor în termeni moleculari.

Modelul Watson-Crick prezintă următoarele aspecte principale:

Molecula ADN constă *din două lanțuri* care se înfășoară în direcții opuse (lanțuri antiparalele) în jurul unui ax imaginar, formînd un dublu-helix. Modelul original al lui *Watson-Crick (figura 1.83.)* a fost „stilizat" de numeroși cercetători, de exemplu, de *Lanngridge (figura 1.83.)* în care simetria este aceeași dar diferă planul de înclinare al dezoxiribozelor.

Imaginile în raze X, ce caracterizează această structură (model), sînt similare pentru toți ADN, extrași din toate speciile, de la viruși pînă la om, precum și pentru nucleoproteide, independent de prezența electroliților neutri.

Modelul poate fi comparat cu o *scară în spirală*, în care unitățile de dezoxiriboză (dR) și fosfat (P) sînt îndreptate spre exterior (mediul apos) și reprezintă „balustradele", iar bazele purinice și pirimidinice, îndreptate spre interior, constituie „treptele" scării în spirală. Planul bazelor este perpendicular pe axa (imaginară) iar planul dR apare în unghi aproape drept față de acela al bazelor.

În principiu, în toate moleculele de ADN apar *unități cu dimensiuni identice* și anume: diametrul dublu-helixului este de 20 Å; bazele adiacente se găsesc la o distanță de 3,4 Å între ele de-a lungul axului helixului și prezintă o rotire de 36°. Unitatea de structură helicală *se repetă identic* după 10 resturi (nucleotide) în fiecare lanț, adică la intervale de 34 Å *(Fig. 1.84)*.

Specificitatea împerecherii bazelor din cele două lanțuri prin legături de H este cea mai importantă caracteristică în asigurarea și menținerea moleculelor de ADN în conformația dublu-helix. În mod *obligatoriu*, adenina dintr-un lanț se împerechează cu timina din celălalt lanț și guanina cu citozina *(figura 1.85)*. Existența acestor perechi obligatorii de baze, **A—T** (în ARN, A—U) și **G—C** este determinată de factori sterici și de caracteristicile legăturilor de H.

Restricția sterică este impusă de natura helicală regulată a „coloanei vertebrale", alcătuită din unitățile „dR-(P)-dR" din fiecare lanț polinucleotidic.

Scanned with OKEN Scanner

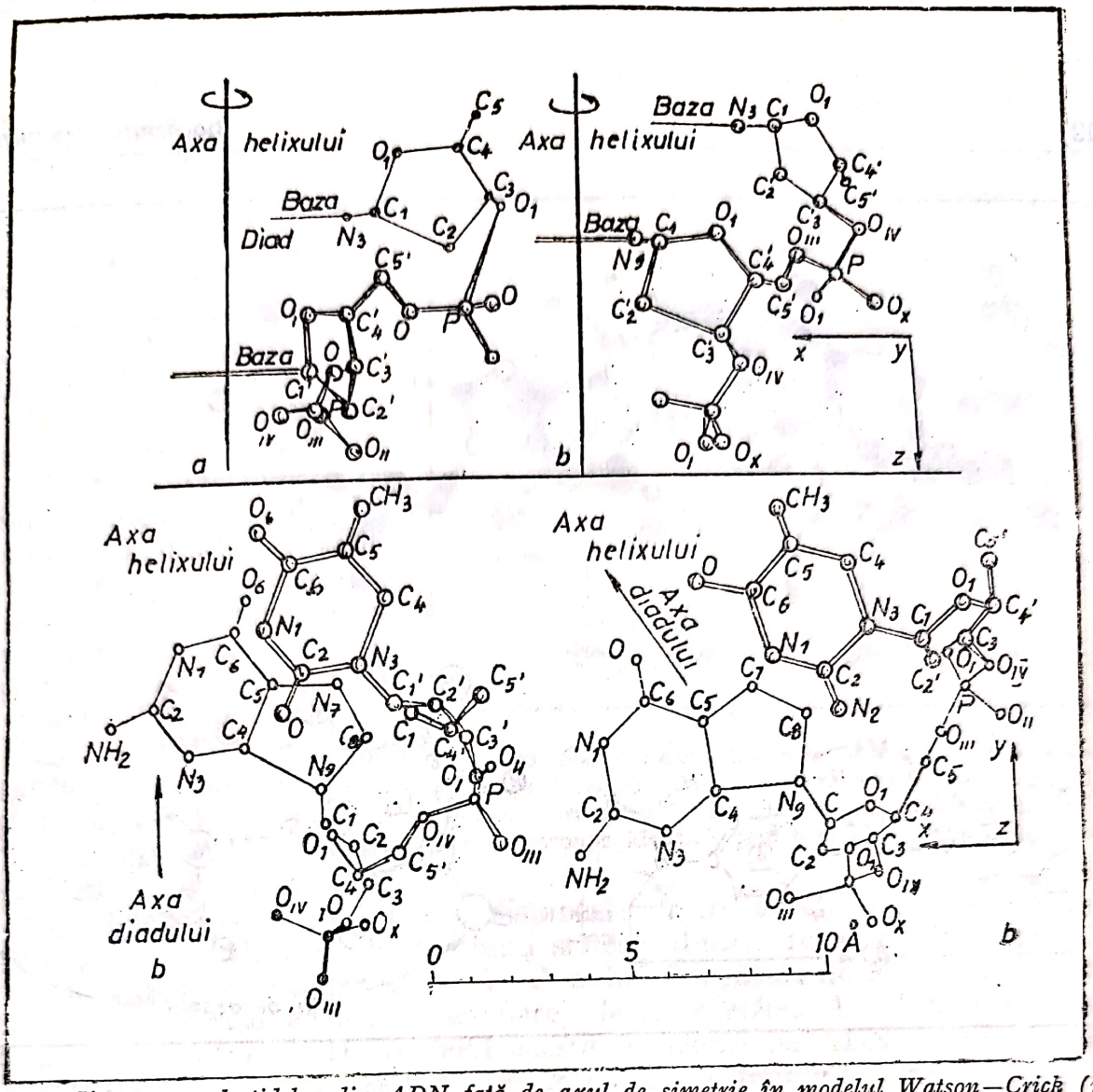


Fig. 1.83. Situarea nucleotidelor din ADN față de axul de simetrie în modelul Watson—Crick (jos) și Langridge (sus) (după M. F. Perutz, din D. Bedeleanu, 1969).

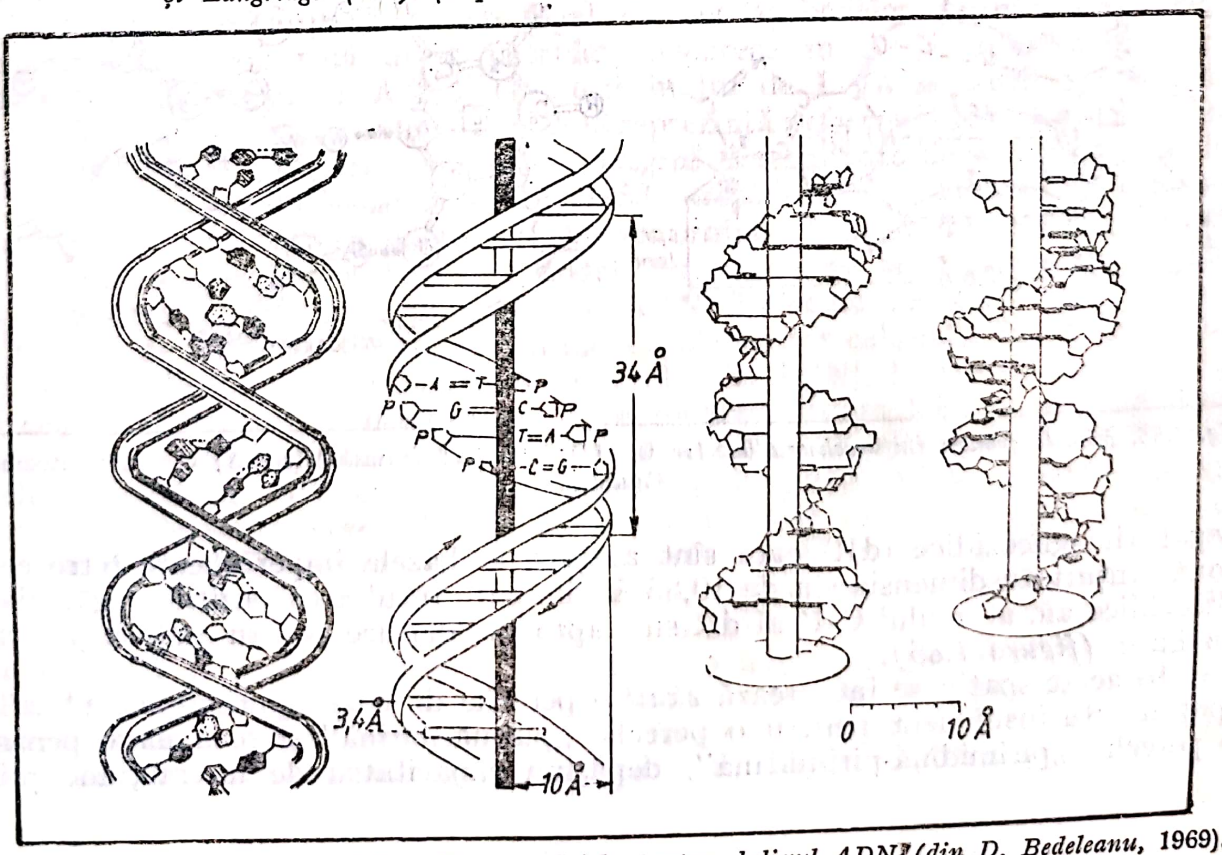


Fig. 1.84. Ilustrări ale modelului Watson—Crick pentru helixul ADN (din D. Bedeleanu, 1969).

Scanned with OKEN Scanner

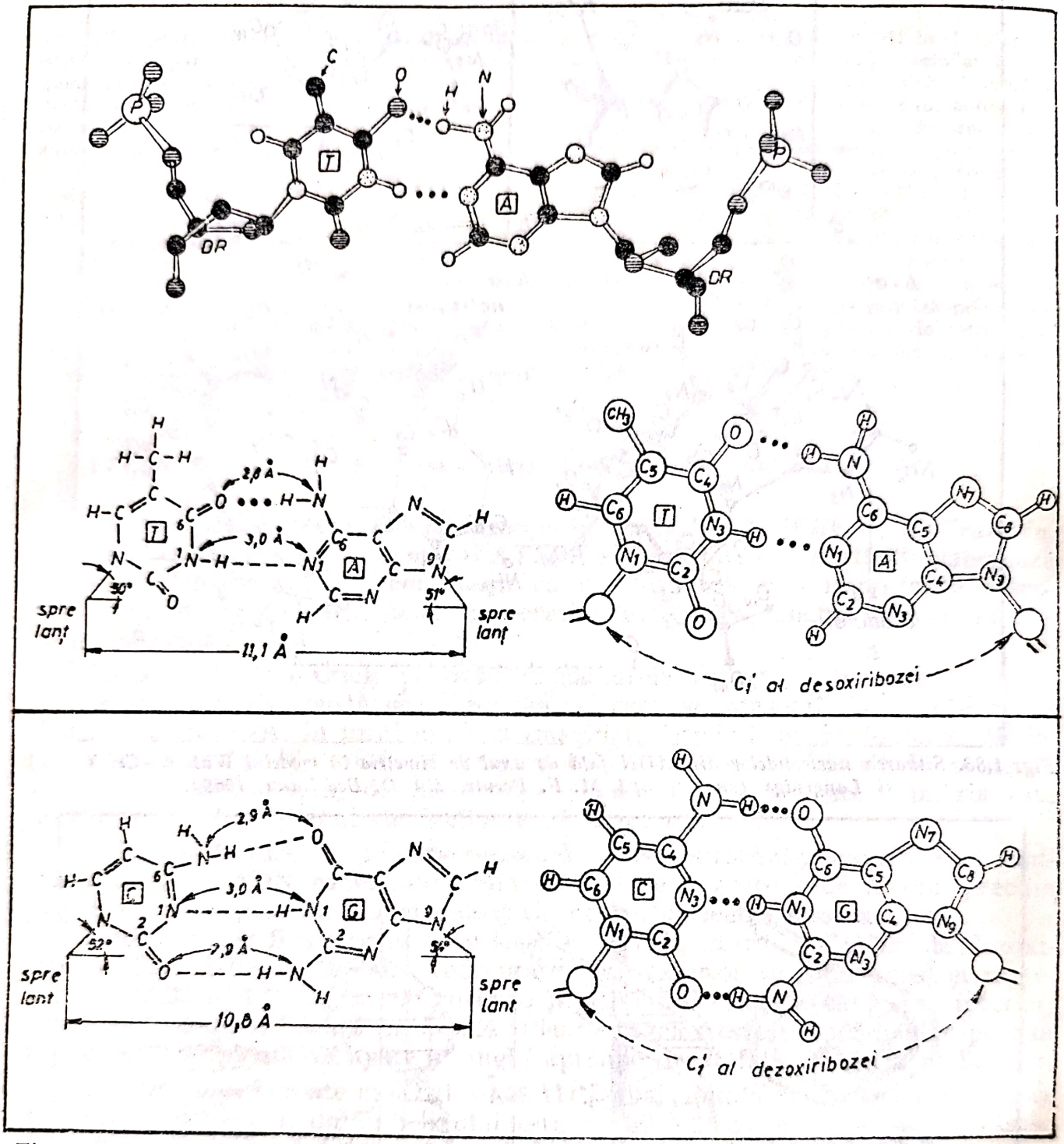


Fig. 1.85. Modele pentru împerecherea bazelor în ADN. T=A: Timină-Adenină; C ≡ G: Citozină--Guanină

Legăturile glicozidice (dR) care sînt atașate la bazele împerecheate între cele două lanțuri au dimensiunea de 10,85 Å, din care rezultă că pozițiile legăturilor glicozidice ale atomului C-1′ al dR sînt aproape identice pentru ambele perechi de baze *(figura 1.86)*.

În acest spațiu se integrează *exact* o pereche de baze „purină-pirimidină"; spațiul este insuficient pentru o pereche „purină-purină" și prea mare pentru o pereche „pirimidină-pirimidină", depășind capacitatea de interacțiune prin

legăturile de H. Deci, factorii sterici impun ca unei baze purinice dintr-un lanţ să-i corespundă, obligatoriu, în celălalt lanţ, o bază pirimidinică şi invers.

Împerecherea bazelor este determinată, de asemenea, de restricţiile determinate de cerinţele legăturilor de H. Atomii de H din bazele purinice şi pirimidinice se găsesc în poziţii bine definite; A nu se poate împerechea cu C şi respectiv G cu T din cauză că ar avea, în ambele cazuri, doi H de o parte a legăturii şi nici unul de cealaltă parte, în schimb, A se împerechează perfect cu T prin *două* legături de H şi G cu C prin *trei* legături de H. Orientarea şi distanţele dintre aceste legături de H sînt optime pentru realizarea interacţiunii strînse dintre respectivele perechi de baze, cu precizarea că perechea G—C avînd 3 legături de H este mai stabilă (rezistentă la diferiţii agenţi de scindare) decît perechea A—T care este unită prin numai 2 legături de H. În felul acesta, molecula de ADN prezintă o grosime aproape identică ($\varnothing = 20$ Å) pe întreaga sa lungime. Din împerecherea obligatorie a unei baze purinice cu una pirimidinică rezultă şi faptul că numărul total al bazelor purinice este egal cu cel al bazelor pirimidinice; datele experimentale confirmă acest postulat, deoarece în ADN dublu-helix de la toate speciile raportul A/T şi G/C este în jur de 1 *(a se vedea 1.3.6.5.3)*.

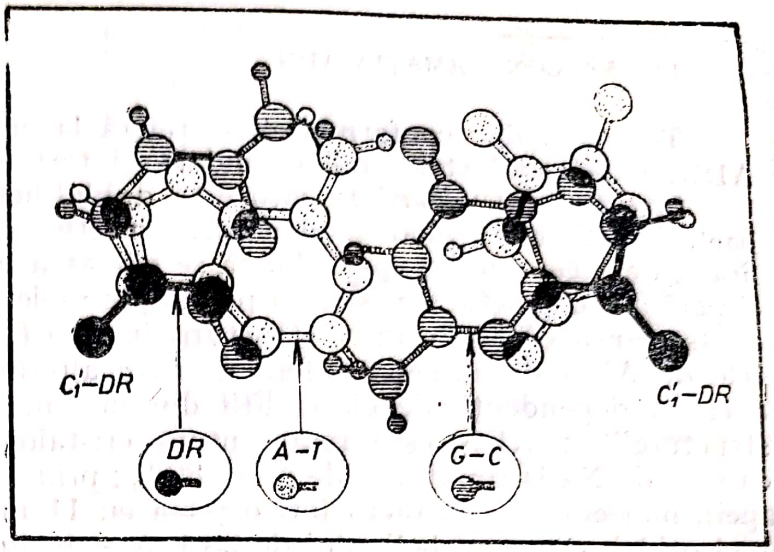


Fig. 1.86. Suprapunerea perechilor de baze A—T (adenină-timină) peste cele C—G (citozină-guanină). Se observă că poziţia legăturii glicozidice a atomului C_1' al dezoxiribozei (DR) este aproape identică pentru ambele perechi de baze.

Secvenţa bazelor de-a lungul unui lanţ reprezintă *informaţia genetică* a moleculei de ADN; celălalt lanţ are o structură *integral* determinată de secvenţa primului.

În acest sens, *Watson* şi *Crick* (1953) arată că „... dacă se dă secvenţa bazelor dintr-un lanţ se poate scrie exact ordinea bazelor din celălalt, pe baza împerecherii specifice a bazelor. Astfel, un lanţ este «*complementar*» celuilalt şi sugerează modul de reduplicare a ADN. Molecula de ADN este, în fond, o pereche de templaţi, fiecare lanţ fiind complementar celuilalt. Să ne imaginăm că înainte de duplicare (replicarea moleculei de ADN), legăturile de H se rup şi cele două lanţuri se desrăsucesc şi se separă; fiecare lanţ va acţiona acum ca templat (matrice) pentru formarea unui nou lanţ şi vor apare astfel 2 molecule de ADN în care se păstrează unul din lanţurile ADN iniţial şi un lanţ este nou. Secvenţa perechilor de baze s-a duplicat exact..." Acest mod de reproducere a ADN se numeşte *semiconservativ*, deoarece pe ambele lanţuri provenite din molecula iniţială (care se conservă nealterat) se formează cîte un nou lanţ (complementar), „copia" exactă a fiecăruia din lanţurile ADN; deci cei doi ADN formaţi sînt absolut identici cu cel iniţial, asigurînd astfel păstrarea intactă a informaţiei genetice. În mod similar, pe anumite părţi din ADN (cu secvenţa bazelor bine determinată), se formează moleculele de mARN, care imprimă secvenţa aminoacizilor din proteine.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.6.5.6. CONFORMAȚIA ADN

Termenul de „conformație" se referă la aranjarea în spațiu a moleculei de ADN, cuprinzînd structura secundară și terțiară.

Structura *secundară in vivo* este dublul-helix (cu excepția unor ADN din bacteriofagii mici), pliat și ghemuit. Structura *terțiară* prezintă o mare flexibilitate, de aceea nu este probabil să se găsească într-o conformație unică, rigidă, ci pare a fi o funcție statistică a populației moleculelor respective de ADN. Apar de asemenea diferențe între structura *in vivo* (nativă) și cea *in vitro*. Filamentele de ADN dublu-helix suferă *in vitro* alterări structurale prin îndepărtarea apei, în dependență de electroliții din mediu. Structura *nativă, in vivo* („live structure") a ADN este reprezentată cristalografic prin rețeaua „B" stabilă ca sare de Na la umiditate de peste 80%; prin scăderea umidității (îndepărtarea apei), molecula se contractă într-o rețea cu 11 nucleotide pe tură (în loc de 10 nucleotide), cu pasul helixului de 28,1 Å și înclinarea bazelor în unghi de 20° față de axa helixului, denumită rețeaua „A" *(figura 1.87)*.

Comportamentul sării de Li a ADN este diferit de al sării de Na. La umiditate de 92% formează o rețea semicristalină „B" (similară cu a sării de Na la 66% umiditate); în prezența ionilor haloizi dă rețeaua „B" (înalt cristalizată), pentru ca la umiditate scăzută și în absența ionilor haloizi să treacă în rețeaua „C" cu 9,3 resturi pe tura de 30,9 Å a helixului. În filamentele „B", singurele cunoscute *in vivo* și în gelurile umede (cu 15—60% ADN), apar structuri hexagonale, dispersate în tot mediul.

1.3.6.5.6.1. **Metode pentru stabilirea conformației ADN**

Majoritatea informațiilor asupra conformației, respectiv a structurii tridimensionale a ADN provin din studiile difracției razelor X, metodele hidrodinamice (vîscozitate, comportarea în ultracentrifugare), spectrele I. R., dispersia optică rotatorie și în mod special din absorbția în U.V. (hipocromismul ADN).

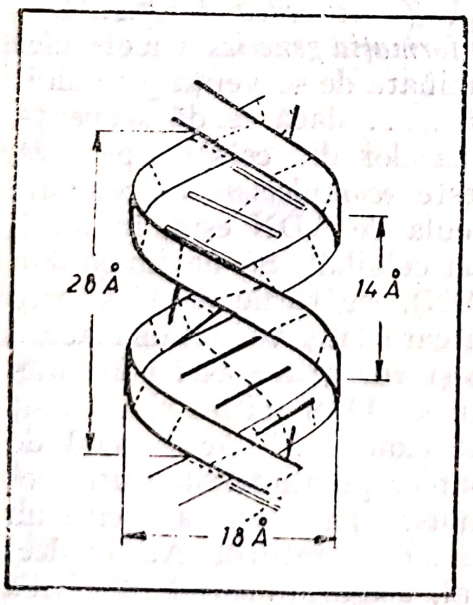


Fig. 1.87. Rețeaua A din ADN nativ (in vivo). **Balustradele „scării" reprezintă resturile de fosfat și dezoxiriboză, iar treptele, perechile de baze.**

Hipocromismul ADN a fost inițial atribuit distorsiunii în distribuția rezonanței electronice datorită legăturilor de H dintre bazele complementare, dar, recent, se consideră că derivă din interacțiunile coulombiene între stările tranziționale ale electronilor din bazele aceluiași lanț. Sistemul de electroni π conjugați a bazelor azotate conferă acizilor nucleici proprietăți cromofore, cu maximul de absorbție la 260 nm; valoarea absorbției ADN este mai mică decît suma aritmetică a absorbțiilor parțiale ale bazelor azotate și respectiv decît a lanțurilor unice, de unde denumirea de *hipocromism*. Invers, denaturarea unei soluții de ADN nativ (de exemplu, prin ridicarea t°) cu formarea ADN-monolanț („despiralare") este însoțită de creșterea gradului de absorbție la 260 nm, de unde denumirea de *hipercromism (figura 1.88)*. Renaturarea (refacerea) ADN prin scăderea t° duce la diminuarea absorbției în U.V. la 260 nm („hipocromism"), chiar și în condițiile în care reasocierea lanțurilor nu este integral reversibilă *(vezi 1.3.6.5.7.1)*.

Topirea termică (T_m). Înregistrarea variației absorbției la 260 nm în raport de ridicarea t° în timp (denaturare termică) oferă o curbă cu aspect sigmoid, numită „curbă de topire" (în sensul că are loc o „topire" a structurii tridimensionale) (figura *1.89*).

Scanned with OKEN Scanner

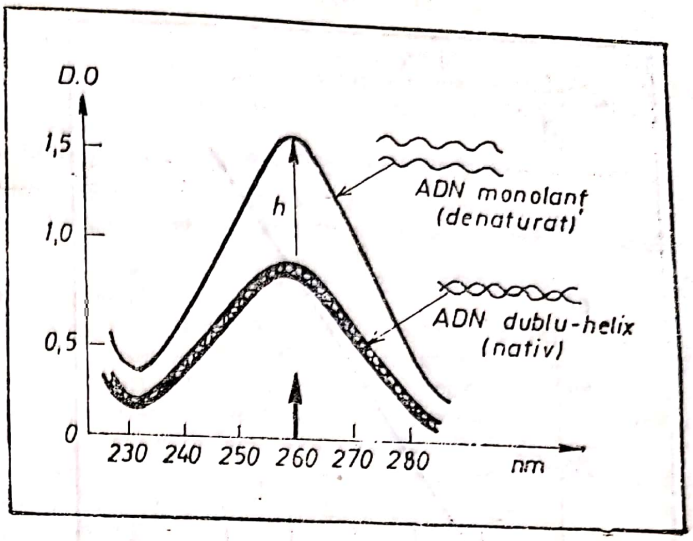


Fig. 1.88. Caracteristicile absorbției ADN nativ și denaturat, cu ilustrarea efectului hipercrom (h).

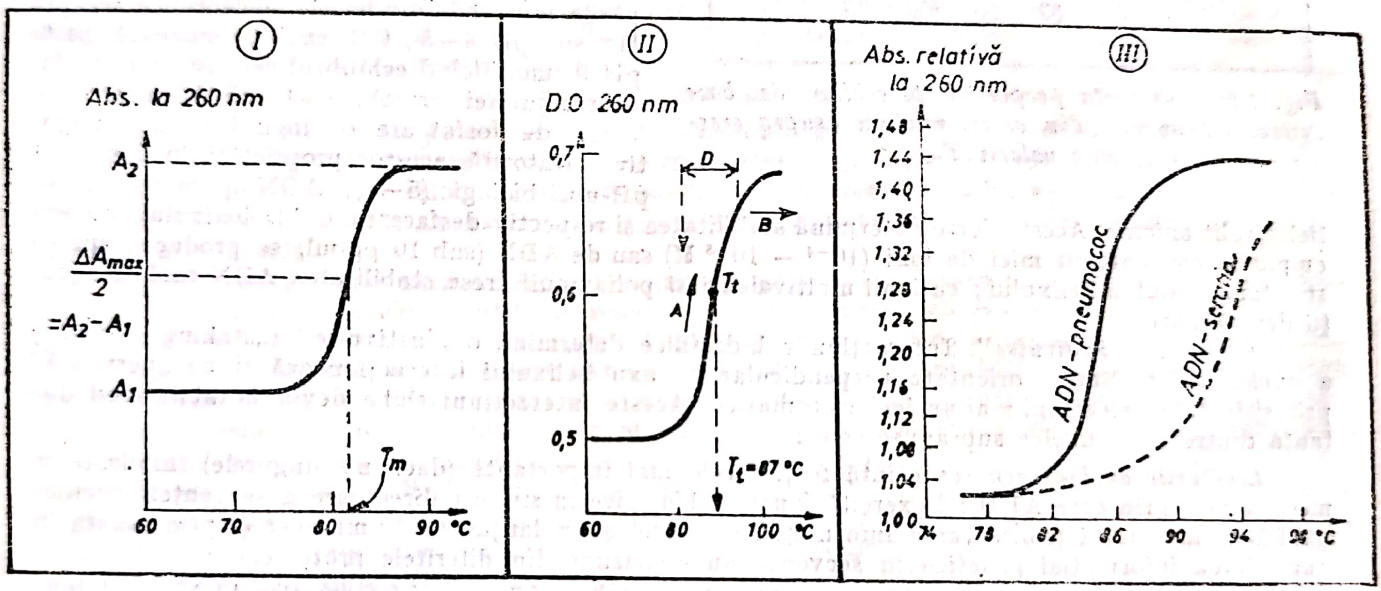


Fig. 1.89. I. *Curbă pentru definirea „topirii" termice (T_m) a ADN.* II. *Curba de denaturare și efectul hipercrom al ADN:* A. despiralarea dublului helix; B. ADN complet despiralat (denaturat); D. domeniul de tranziție; T_t = temperatura de tranziție, respectiv T_m. III. *Curba denaturării termice a ADN din pneumococ și seratia*

Proiecția punctului de inflexiune a curbei de topire pe axa absciselor reprezintă o caracteristică pentru fiecare tip de acizi nucleici și se notează cu T_m (de la „melting" = topire). Profilul „topirii termice" permite aprecierea denaturării ADN dublu helix, spre formele monolanț (vezi 1.3.6.5.7.1) și indică raportul bazelor A—T/G—C. Porțiunile bogate în A—T ale lanțului sînt afectate la $t°$ mai scăzute și, respectiv, cu cît proporția de G—C este mai mare, cu atît valoarea T_m este deplasată spre $t°$ mai ridicate *(fig. 1.90)*.

Această comportare se datorește faptului că perechea G—C are trei legături de H și A—T numai două; în segmentele bogate în C—G proporția legăturilor de H este mai mare și este necesară o cantitate mai mare de energie pentru desfacerea lor, adică pentru distrugerea („topirea") structurii tridimensionale. Alura curbei T_m, de „topire", oferă de asemenea informații asupra omogenității populațiilor moleculare; în moleculele mici, cu populație omogenă, tranziția este bruscă, adică Δ_A maxim se produce în limite mai restrînse ale temperaturii, în timp ce în moleculele mari, cu populație neomogenă, tranziția este mai lentă și curba de topire are o pantă mai înclinată.

Spectroscopia de rezonanță magnetică este utilă în studiul legăturilor specifice ale ADN cu ionii metalici paramagnetici.

Metoda schimbului ^3H cu ADN este de un deosebit interes. După echilibrarea în ^3H_2O, ADN se transferă în apă obișnuită și se urmărește rata dispariției izotopului; schimbul depinde de „în-

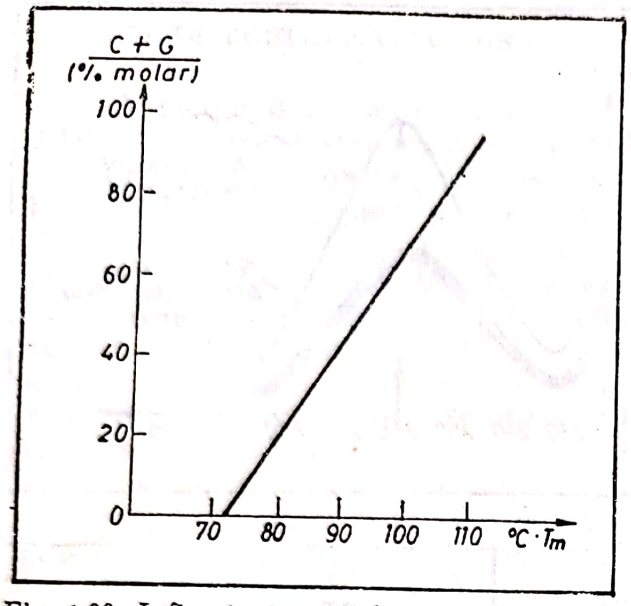


Fig. 1.90. Influența proporției perechilor de baze „citozină-guanină" din acizii nucleici asupra creșterii valorii T_m.

treruperile" („breathing") și de fluctuațiile în structura dublu-helixului. Această metodă reflectă aspectul dinamic al conformației secundare și invederează că ADN nativ din timusul bovin are un număr de 2,3 ± 0,2 H relativ ușor de schimbat pe perechea de nucleotide, ceea ce corespunde numărului de H dintre 2 baze complementare și servește la determinarea acestora.

Recent, *polarografia oscilografică* a completat informațiile asupra ADN nativ și a artefactelor determinate prin izolarea lui.

1.3.6.5.7. FORȚELE IMPLICATE ÎN CONFORMAȚIA ADN

Forțele electrostatice datorite ionizării. Grupările ionizabile din bazele nucleotidice acceptă H^+ sub pH 4—5; OH enolici ionizează peste pH 9 (modificînd echilibrul ceto ⇌ enol în favoarea primei forme); peste pH 3, fiecare moleculă de fosfat are o singură sarcină negativă. Datorită acestor proprietăți, în domeniul pH-ului biologic (5—9), ADN apare ca un polielectrolit anionic. Aceste forțe determină stabilitatea și respectiv desfacerea dublu-helixului, de exemplu la concentrații mici de ioni (10^{-4} — 10^{-5} M) sau de ADN (sub 10 μg/ml) se produce ruperea spontană a dublu-helixului; cationii multivalenți și polianionii cresc stabilitatea ADN față de agenții denaturanți.

Forțele de „înstivuire". Interacțiunile hidrofilice determină o „înstivuire" („staking = stivă") a nucleotidelor. Bazele orientate perpendicular pe axul helixului interacționează și pe „verticală" prin sistemul de electroni π ai nucleelor aromatice. Aceste interacțiuni slabe devin notabile cînd distanța dintre două nuclee suprapuse este mică.

Legăturile de hidrogen reprezintă forțele cele mai importante (dacă nu singurele) implicate în mecanismele prin care ADN își exercită funcțiile biologice în sinteza directoare a secvenței specifice a ADN nou formați (conservarea informației genetice) și în lanțul ARN mesager și prin acesta în transcrierea informației genetice în secvența aminoacizilor din diferitele proteine.

Forțele hidrofobe și hidrofile, în ansamblu, determină stabilitatea conformației ADN și solubilitatea sa, datorită în special grupărilor fosfat, îndreptate spre mediul apos și a bazelor heterociclice situate la interiorul dublu helixului.

1.3.6.5.7.1. Denaturarea și reasocierea (renaturarea) ADN

În ADN nativ, perechile de baze complementare, unite între ele prin legături de H sînt orientate, datorită caracterului hidrofob, spre interiorul macromoleculei; prin *denaturare* aceste legături se rup și bazele devin „expuse" agenților de mediu, de exemplu, radiațiilor U.V. pe care le absorb într-o măsură mai mare (efectul „hipercromic", *vezi 1.3.6.5.6.1*). În ADN complet denaturat, absorbția este practic identică cu absorția unei soluții care conține cantități corespunzătoare (identice) de mononucleotide. În soluții diluate, moleculele de ADN sînt instabile și se denaturează chiar la $t°$ camerei. Gradul de denaturare este accentuat prin pH-urile extreme și prin încălzire la $t°$ critică; în ultimul caz, denaturarea este funcție aproape liniară a log concentrației ionice. Stabilitatea structurii secundare față de denaturare și $t°$ crește cu proporția perechilor de baze G—C; înlocuirea T cu I—U (iod-uracil) sau Br—U crește T_m al ADN. De asemenea, stabilitatea termică crește cu concentrația unor ioni (de exemplu, ionii bivalenți: Mg^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+}, chiar la concentrații mici), în timp ce alții (Cu^{2+}, Pb^{2+}) o scad, prin ruperea legăturilor de H. Diaminele alifatice cresc T_m al ADN, în raport cu concentrația și lungimea lanțului aminei; spermina, spermidina, sulfatul de protamină cresc T_m în dependență de perechile A—T. Unele substanțe scad stabilitatea helixului: uree, salicilați, formaldehida, formamida, unii alcooli; agenți denaturanți foarte puternici sînt acidul tricloracetic, tiocianații, perclorații (de exemplu, în perclorat de sodiu 7,2 *M*, T_m este cu

aproximativ 40°C mai scăzut decît în NaCl 0,2M); razele X, U.V., albastrul de metil scad de asemenea T_m.

O altă metodă experimentală de apreciere a denaturării se bazează pe proprietatea coloanelor de hidroxiapatită (fosfat de calciu) de a reține ADN-dublu lanț, în timp ce monolanțurile (ADN denaturat) trec prin coloană. Avantajul metodei constă în posibilitatea fracționării unor cantități mari de ADN, pe baza gradului de reasociere, după denaturarea termică.

Cinetica reasocierii (refacerii, renaturării) ADN din *E. coli* sau fagul T_4 corespunde unei reacții bimoleculare: $S + S' \xrightarrow{k} D$, în care S și S' sînt moleculele monolanț complementare, D = dublu helix reasociat (renaturat) și k = constanta de viteză a asocierii. Pentru o asemenea reacție, fracțiunea f a moleculelor monolanț scade în timp: $f = \frac{1}{1 + kC_0t}$, în care C_0 este concentrația totală a ADN (exprimată în molecule de nucleotide pe litru) și t = timpul (în secunde). Pentru un anumit ADN, în condiții experimentale definite (de exemplu, tărie ionică, $t°$, mărimea fragmentelor de ADN), f depinde numai de C_0t, adică de produsul dintre concentrația ADN și timp. Reprezentarea cineticii reasocierii față de log C_0t oferă o curbă cu aspect sigmoid. Valoarea C_0t ce corespunde reasocierii a jumătate din ADN ($f = 0{,}5$) notat cu $C_0t_{0,5}$ constituie un indice caracteristic, fiind de aprox. 9 M sec pentru ADN din *E.coli* și 0,3 M sec pentru ADN din fagul T_4. Aceste valori arată că ADN din *E.coli* se reasociază de aproximativ 30 de ori mai încet ca cel din fagul T_4. În *figura 1.91* se prezintă curbele de reasociere și $C_0t_{0,5}$ al unor tipuri de ADN.

Explicația acestei comportări este că, în comparație cu T_4—ADN, molecula de ADN din *E.coli* fiind mai mare și numărul tipurilor de fragmente obținute prin denaturare („forfecare") este mai mare, dar, concentrația relativă a fragmentelor complementare este mai mică și astfel posibilitatea de a se „întîlni" pentru a se recombina mai scăzută și, deci, viteza de reasociere mai mică.

Cercetările intreprinse pe o varietate de molecule de ADN de la procariote arată că $C_0t_{0,5}$ se corelează cu mărimea genomului. Genomul mamiferelor fiind cu trei ordine de mărime (deci de 1.000 de ori) mai mare ca cel din *E.coli*, teoretic, $C_0t_{0,5}$ ar trebui să aibă valori de 10^4 sec; pentru o soluție 10^{-4} de ADN cu un asemenea $C_0t_{0,5}$ ar fi necesar pentru reasociere un timp de 10^8 sec (aproximativ 3 ani).

Studiile asupra renaturării ADN de la șoarece au condus la rezultate neașteptate prin obținerea a trei profiluri distincte ale cineticii de reasociere: *foarte rapide*, cu reasocierea în cîteva secunde (10% din total), intermediare (20%) și lente (70%). Separarea acestora se poate efectua și prin ultracentrifugare. Analiza curbelor C_0t sugerează că primul profil se datorește ADN care conține în structura sa milioane de „copii" de secvențe, care se repetă, alcătuite din aproximativ 300 perechi de baze. Existența unor asemenea fragmente identice în număr mare permite ca fragmentele complementare să se „întîlnească" ușor și astfel viteza de reasociere să fie foarte ridicată. În mod similar, toți ADN din eucariote (cu excepția drojdiei) conțin ADN, denumiți „sateliți" cu „copii" care se repetă, situați în regiunile centrometrice, de exemplu, 30% din ADN uman conține secvențe care se repetă de cel puțin 20 de ori; ADN din *Drosophila virilis* conține o bandă principală și trei benzi satelit („less-dense satelite bands"), alcătuite exclusiv din ADN în care „copiile" se repetă cu o mare frecvență. O parte

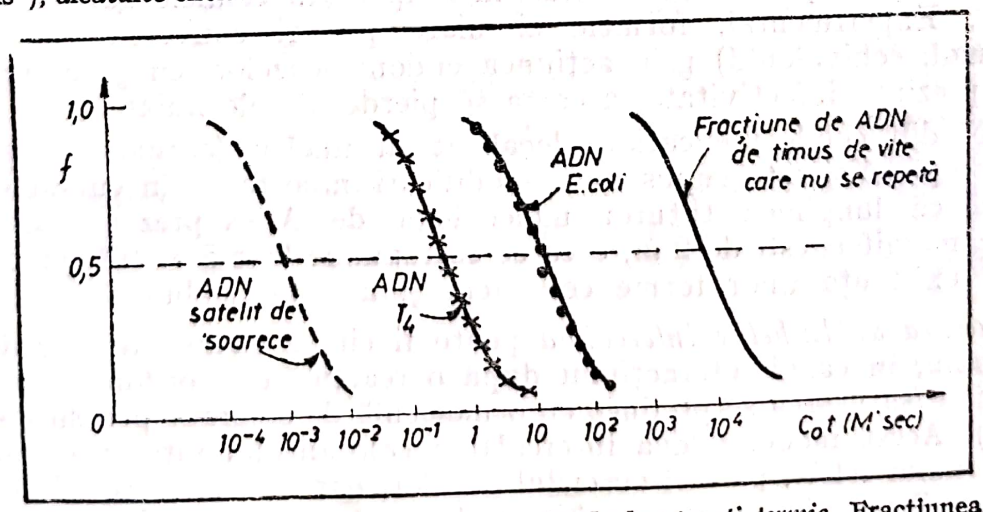


Fig. 1.91. Curbele pentru cinetica reasocierii unor ADN denaturați termic. Fracțiunea moleculelor monolanț este reprezentată ca funcție a C_0t. Reasocierea rapidă a ADN satelit de șoarece ilustrează conținutul său foarte ridicat în secvențe „repetative" (*după R. J. Britten, D. E. Kohne*, Science, *161*, 530, 1968).

din ADN şoarecelui conţine 10^3-10^4 „copii" şi se reasociază cu o viteză intermediară. Majoritatea ADN de şoarece (70%) se reasociază foarte încet, deoarece conţine numai secvenţe unice sau aproape unice, care nu se repetă *(L. Stryer, 1975)*.

1.3.6.5.8. TIPURI DE ADN. SUBUNITĂŢI DE ADN

ADN-dublu-helix. Cromozomul *E. coli* este o moleculă unică de ADN dublu-helix, cu gr. mol. $2,3 \times 10^9$, alcătuită din $3,4 \times 10^6$ perechi de baze, asimetrică, liniară, cu lungimea de 12×10^6 Å (1,2 mm) şi Ø de 20 Å, ceea ce denotă că lungimea sa corespunde dimensiunilor macroscopice, în timp ce diametrul său este la scară atomică. Cel mai mare cromozom de la *Drosophila melanogaster* conţine o singură moleculă de ADN cu $6,2 \times 10^7$ perechi de baze, cu lungimea de 2,1 cm *(B. Zimm)*; după alţi autori ar avea o gr. mol. de 58×10^9 daltoni.

Pentru a releva semnificaţia acestor lungimi ale ADN menţionăm că molecula hemoglobinei are dimensiunea maximă de 65 Å iar colagenul, una din cele mai mari proteine, o lungime de 3.000 Å. Desigur, molecule atît de mari şi asimetrice ca ale ADN sînt foarte sensibile la forţele de „forfecare" şi se degradează uşor, dacă nu se iau măsuri speciale de precauţie, în segmente cu gr. mol. de cîteva mii de ori mai mici decît a moleculei originale *(L. Stryer, 1975)*.

Structuri circulare. Studiile hărţilor genelor din *E. coli* au anticipat datele electronomicroscopice care arată că unele molecule intacte de ADN sînt *„circulare"* şi că acest aspect reprezintă entităţi reale şi nu numai artefacte. Termenul „circular" se referă la continuitatea lanţurilor de ADN şi nu la forma lor geometrică. Deoarece ADN bacterian cu gr. mol. de $2,8 \times 10^9$, cu 4 milioane de perechi de baze şi lungimi de 1,36 mm, depăşeşte de aproximativ 1.000 de ori diametrul maxim al bacteriei este evident că el trebuie să se găsească *in vivo* într-o organizare foarte compactă, care să-i permită localizarea în dimensiunile celulei. Molecula de ADN a unor viruşi, de exemplu, din bacteriofagul λ, suferă interconversiuni între formele liniare şi circulare: prima formă este prezentă în interiorul particulei de virus, în timp ce în celulele gazdei apare forma circulară. Experimental, formele circulare pot fi convertite în cele liniare (cu gr. mol. echivalentă) prin acţiunea endonucleazelor, cu precizarea că dacă primele prezintă infectivitate, aceasta se pierde la cele liniare.

ADN din celulele eucariote localizat în nucleu (cromozomi) are o organizare complexă şi este supus unor modificări importante în cursul mitozei. Se apreciază că lungimea tuturor moleculelor de ADN prezente într-o singură celulă de mamifere este de 2 m, ceea ce corespunde la $5,5 \times 10^9$ perechi de baze, sugerînd existenţa unor forme compacte şi a unor „subunităţi" de ADN.

Structura dublu-helix intercalată poate fi citată ca un exemplu de artefact, de exemplu, în cazul interacţiunii după o reacţie de ordinul zero a ADN cu acridina (saturarea se produce cu o moleculă de colorant pentru 2—3 perechi de baze). Acest model relevă intercalarea colorantului între perechile de baze ale duplexului ADN, paralel cu ciclul bazelor, dar fără alterarea dublu-helixului şi a legăturilor de H dintre perechile de baze. Asemenea conformaţii pot rezulta din interacţiunea ADN cu o varietate de molecule, dintre care unele pot fi mutagene (produc de exemplu, „inserţie-deleţie") sau carcinogene, de unde apare interesul lor biologic-terapeutic.

Scanned with OKEN Scanner

Structura dublu-helix întrerupt și subunități de ADN. În cadrul tipului dublu-helix (general) pot apare „întreruperi" cu o frecvență de cel mult 1 la 3.000 nucleotide (există date care sugerează o frecvență de numai 1 : 30.000 în ADN nativ). În privința semnificației acestor „întreruperi" se consideră că ele pot avea o localizare fixă (de exemplu, în T_5-ADN), dar, în majoritatea moleculelor se găsesc la întîmplare și servesc, probabil, ca puncte de inițiere în reduplicarea ADN.

Afirmația, pe baza gr. mol., că cromozomul este un singur ADN este valabilă pentru viruși, probabilă pentru bacterii, dar nu poate fi nici acceptată nici negată pentru celulele ființelor superioare. În structura cromozomilor poate să apară un singur ADN dublu-helix cu cele două lanțuri neîntrerupte, dar este posibil să existe un lanț „întrerupt", cu apariția unor „subunități" sau a unor asociații laterale ale dublu-helixului ADN.

Cromozomul bacterian cu o singură unitate de ADN este în concordanță cu rata de replicare și tipul de dedublare al ADN. Situația din celulele plantelor superioare și ale omului (și animalelor) sugerează că biosinteza (replicarea) ADN decurge simultan în mai multe „puncte de creștere", fără a se cunoaște însă exact numărul acestora. Întreruperea lanțului, din loc în loc, la nivele diferite în cele două fire ale ADN-ului, permite o replicare mai rapidă. Existența unei multiplicități de subunități separate care replică ADN, unite „capăt la capăt" prin *legături non-ADN* este confirmată și prin analiza proteinelor reziduale asociate cu ADN din sperma mamiferelor. Aceste proteine, puternic legate de ADN, sînt constituite în proporție de 1/3 din hidroxi-aminoacizi (Ser, Tre), care presupun participarea lor în legături P-diesterice cu ADN. Este de menționat că și cele mai purificate preparate de ADN conțin 0,1—1% proteine reziduale refractare la separarea, chiar repetată, cu cloroform- alcool izoamilic sau fenol și la digestia proteolitică. În plus, ele au o compoziție diferită de a proteinelor țesutului din care derivă, ceea ce exclude eventualitatea unei simple contaminări.

Aceste *subunități de ADN* legate prin proteine reziduale ar permite asocierile laterale între dublul-helix ADN, considerîndu-se că proporția mai mare de asemenea proteine ar cauza agregări ale ADN și modificări ale structurii lor terțiare. Subunitățile din cromozomii celulelor superioare sînt puțin cunoscute, sugerîndu-se prezența unor subunități terminale cu gr. mol. de $1{,}4 \times 10^6$.

ADN monolanț. În domeniul pH-ului de 5—9 (biologic), ADN este supus la 2 forțe antagoniste: *a.* întinderea lanțului, cauzată de repulsia dintre grupările fosfatice, care mărește extensia moleculei, și *b.* forțele de legare dintre baze, capabile să formeze segmente cu structură secundară helicoidală. Reducerea sau inhibarea interacțiunilor dintre baze (de exemplu, prin ridicarea $t°$) protonează grupările bazice și, afectînd legăturile dintre ele, molecula tinde spre extensie; „titrarea alcalină", prin ionizarea grupelor OH-enolice, abolește conformația helicoidală și crește numărul locurilor anionice, cu extensia maximă a lanțurilor de ADN.

În prezent se admite că ADN nativ poate fi nu numai dublu-helix circular ci și monolanț, ca în cazul ADN din $\varphi \times 177$, un virus mic, care infectează *E. coli* (R. Sinsheimer). Argumentele sînt următoarele: perechile de baze nu respectă regula generală A=T și G=C (obligatorie pentru dublu-helix); vîscozitatea mai mică decît a ADN din *E. coli* (la concentrații identice); proprietățile sale hidrodinamice pledează pentru un polimer încolăcit „la întîmplare", spre deosebire de ADN dublu-helix, care se prezintă ca o „bară" relativ rigidă; grupările acide ale bazelor reacționează ușor cu formaldehida, spre deosebire

Scanned with OKEN Scanner

de cele ale dublu-helixului, care sînt virtual inaccesibile reactivului. Această formă monolanţ nu contravine schemei universale de reduplicare a lui Watson-Crick, deoarece apare numai în anumite perioade ale ciclului virusilor. În celula gazdă *(E. coli)* se găseşte un X174-ADN dublu lanţ care asigură reduplicarea ADN-ului virusal, proces localizat în etapa în care se găseşte în această celulă. Astfel, ADN alcătuit dintr-un singur filament, cu gr. mol. de $1,7 \times 10^6$, apare în *E. coli* ca ADN dublu-helix, cu gr. mol. dublă.

1.3.6.6. *ACIZII RIBONUCLEICI. ARN (RNA)*

Acizii ribonucleici (ARN) reprezintă materialul genetic al unor virusi mici, dar în organismele celulare apar doar în transmiterea informaţiei genetice. ARN se găseşte atît în citoplasmă cît şi în nucleu, predominînd în prima. Astfel, celula conţine trei tipuri principale de ARN: ARN ribozomali (*r*-ARN) în ribozomi, în cantitatea cea mai mare, implicaţi în biosinteza proteinelor; ARN solubili (*s*-ARN) sau de transport (*t*-ARN) şi ARN mesageri (*m*-ARN) sau de informaţie (*i*-ARN), foarte instabili *(tabelul 1.37)*.

Cercetările iniţiale cu raze X asupra structurii ARN au fost deconcertante (imagini difuze, necaracteristice); ulterior s-au obţinut imagini care relevă

TABELUL 1.37

Caracterizarea acizilor ribonucleici (ARN RNA, RNS)

Tip de ARN	Prop. din total (%)	Nr. specii	Coef. sedim. (S)	Greut. mol.	Nr. nucleotide	Compoz. în baze	Structura (conformaţie)
RIBOZOMAL (r-ARN)	75—85	3	23(28) 16(18)	$0,5-1,6 \times 10^6$ $1,2 \times 10^6$ $0,55 \times 10^6$	3100—3700 1500—1700	A,U,G,C şi baze metilate	Monocatenar, dezordonat, cu domenii lineare-helicale; retropliat; compact
	1		5	$3,6 \times 10^4$	100—120		Heterogen cu domenii împerecheate
TRANSFER (t-ARN) sau SOLUBIL (s-ARN)	10—20	≈60	4	$2,5-3 \times 10^4$	70—90	A.U.G.C. şi baze metilate, tiolate şi rare	Heterogen; parţial dublu-helix; sub formă de „foaie de trifoi"
MESAGER (m-ARN) sau de INFORMAŢIE (i-ARN)	5—10	10^2 (10^3)	6—25	$2,5 \times 10^3$—1×10^6	75—3000	A,U,G,C	Heterogen; monocatenar liniar

o structură în lanț similară ADN, de care diferă, însă, prin prezența unei grupări —OH libere la C(2') a fiecărui rest de riboză (care apare în locul dezoxiribozei din ADN) și prin prezența uracilului, în locul timinei.

Unele tipuri de ARN virali au raportul A/U aproximativ egal cu 1 și G/C diferit; în rARN din *E. coli* și din drojdie nici una din aceste valori nu se apropie de unitate; în *t*-ARN din *E. coli* ambele raporturi sînt apropiate de 1 (ca în structurile dublu-helix cu baze complementare) în timp ce în *t*-ARN din drojdie valorile sînt diferite. Compoziția și raportul bazelor din *r*- și *t*-ARN diferit, chiar în cadrul aceleiași specii, sugerează că ei se formează prin replicarea numai a unei porțiuni din ADN cromozomial; în acest sens pledează și dimensiunile lor mai mici *(tabelul 1.37)*.

1.3.6.6.1. TIPURI DE ACIZI RIBONUCLEICI

1.3.6.6.1.1. ARN solubil (*s*-ARN) sau de transport (*t*-ARN)

În partea solubilă a celulei (citosol) se găsește aproximativ 5—15% din ARN total sub formă liberă, solubilă (de unde denumirea de *s*-ARN), care leagă specific fiecare din cei peste 20 aminoacizi implicați în biosinteza proteinelor, reprezentînd forma lor de transport (de unde denumirea de *t*-ARN).

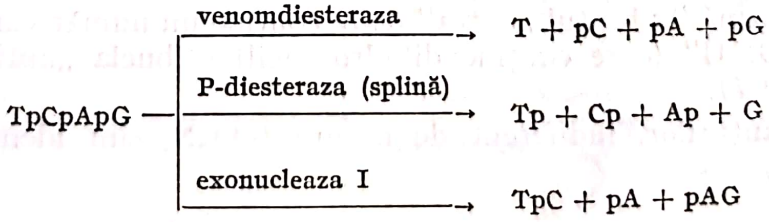
Izolarea și fracționarea t-ARN au beneficiat de proprietatea lor de a lega aminoacizii specifici, sub forma unor combinații care pot fi mai ușor caracterizate. Moleculele lor sînt relativ mici și secvența nucleotidelor dintr-o anumită regiune determină specificitatea lor față de anumit aminoacid (parte variabilă); după legarea aminoacizilor ei pot fi izolați sub formă de combinații „aminoacid specific-nucleotide specifice". S-au obținut astfel Ala-, Val-, His-, Tir-t-ARN, cu o puritate de 66%, 60%, 23% și respectiv 65%. S-a constatat că Ala-*t*-ARN are o compoziție nucleotidică diferită de a Val-*t*-ARN și Tir-*t*-ARN, dar ultimii doi prezintă mari asemănări; pentru aceeași *t*-ARN pot apare diferențe de specie, de exemplu Tir-*t*-ARN din ficat diferă de cel din drojdie.

În timp ce *t*-ARN liberi sînt alterați prin acțiunea oxidantă a periodatului, complexele cu aminoacizii sînt rezistente și pot fi separate pe coloane de DEAE-celuloză-dextran sau serumalbumină metilată; ultima metodă a permis separarea a 16 specii de *t*-ARN (încărcați cu aminoacizii specifici). Pentru fracționarea diferiților *t*-ARN se poate utiliza și precipitarea lor cu spermină, histonă, săruri cuaternare de amoniu etc.

În metoda „hărții" nucleotidelor („mapping") se hidrolizează molecula ARN cu ARN-aza pancreatică și se identifică nucleotidele formate prin cromatografie (pe coloană, hîrtie), prin electroforeză, sau prin tehnicile combinate: cromatografie, urmată de electroforeză.

În determinarea secvenței nucleotidelor se poate aplica cu succes specificitatea enzimelor; de exemplu, Takadiastaza-RN-aza T_1 scindează legăturile fosfat-ester dintre G—3'-riboză și baze.

Astfel, în cazul secvenței: TpCpApG se pot aplica următoarele enzime:



Compușii carbodiaminici de tipul R'—N=C=N—R'' ai UMP și GMP, spre deosebire de a celorlalte nucleotide, manifestă rezistență față de RN-aza pancreatică, dar se pot hidroliza la pH 10,5 la 20°C/20 ore.

Utilizînd în sistemele de eluție uree, formamidă sau etilenglicol, reținerea pe coloana de DEAE-celuloză este dependentă numai de gradul de polimerizare al ARN și independentă de compoziția în baze; în schimb, cu bicarbonat de amoniu, reținerea depinde mai mult de compoziția în baze decît de lungimea ARN.

Scanned with OKEN Scanner

Izolarea și îndepărtarea moleculelor contaminante pe DEAE-celuloză, urmată de fracționarea pe coloană de Sephadex a condus la separarea a 5 fracțiuni pentru Ser-*t*-ARN din drojdie, iar pe coloana cu serumalbumină-kiesselgur se poate evidenția rapid eterogenitatea unui *t*-ARN specific pentru un anumit aminoacid.

Metodele de distribuție în contracurent, cu solvent de bază izopropanol-formamidă-fosfat, sînt de asemenea convenabile și au contribuit atît la separarea a doi Leu-*t*-ARN și doi Liz-*t*-ARN din ficatul de șobolan cît și la stabilirea secvenței complete a nucleotidelor din *t*-ARN *(R. Holley, 1965)*, care se înscrie ca *prima structură de acizi nucleici pe deplin elucidată.*

Caracterul polianionic al oligonucleotidelor este exploatat pentru separarea pe coloane cu schimbători de ioni (anionici), pe baza lungimii lanțurilor și a naturii bazelor, deoarece oligonucleotidele bogate în purine au, în general, o trecere mai lentă decît cele pirimidinice; prin schimbarea pH-ului și asocierea cu alte tehnici se obțin date valoroase asupra structurii *t*-ARN.

O serie de metode urmăresc separarea *t*-ARN pe baza compoziției bazelor, utilizînd tehnici diferite: hidroliza acidă, bazică, enzimatică, cromatografia, electroforeza etc. În acest sens, este de menționat că bazele uzuale, cu excepția adeninei (A), reacționează cu N-Br-succinimida în soluție acidă, scad absorbția la 270 nm și permit astfel calcularea, prin diferență, a cantității de adenină.

Bazele „minore" servesc de asemenea ca repere importante în molecula ARN, astfel, de exemplu, I (inozina), Me-I, dihidro-U, 4-tio-U, 2-tio-U, N-formil-aminoacil-A etc.

Analiza grupelor terminale marcate în poziția 5'-P (cu formarea $^{14}O^{3}H$-pirofosfaților) este foarte specifică; oxidarea grupării 2'-3'-diol finală liberă (în ARN) cu metaperiodat și tratarea cu ^{35}S-tiosemicarbazidă a aldehidei formate, evidențiază nucleotidele terminale, identice pentru toate tipurile de *t*-ARN.

Deși există un număr și o varietate mare de *t*-ARN, avînd în vedere rolul lor în biosinteza proteinelor, care implică interacțiuni cu *m*-ARN, cu locurile A și P din ribozomi și cu enzimele care catalizează formarea legăturilor peptidice, moleculele *t*-ARN au unele caractere structurale comune.

În prezent se cunoaște structura a numeroase specii de *t*-ARN. În *figura 1.92* se prezintă structura Ala-*t*-ARN (din drojdie) iar în *figurile 1.93* și *1.94*, modelele schematice ale *t*-ARN. Forma lor generală se aseamănă cu un „trifoi în patru foi"; celor patru „ramuri" sau „brațe", li se poate adăuga, uneori, un al cincilea braț, adițional. Toți sînt alcătuiți din 79—93 ribonucleotide care le conferă o greut. mol. medie de 25.000.

Conțin 7—15 baze „minore" (anormale) pe moleculă (pînă la 10% din numărul total de baze). Deși rolul acestora nu se cunoaște precis, se consideră, de exemplu, că metilarea bazelor împiedică formarea perechilor și le conferă alte proprietăți de interacțiuni; caracterul hidrofob al regiunilor bogate în baze metilate este important pentru stabilirea unor interacțiuni (legături) cu sintetazele și cu proteinele ribozomale.

Aproximativ jumătate din nucleotide apar împerecheate, formînd regiuni dublu-helix. Cinci grupuri de baze nu sînt împerecheate: regiunea 3'-CCA terminală; bucla TψC (care și-a primit denumirea de la secvența „ribotimină-pseudouracil (ψ)-citozină"); brațul „extra" (care conține un număr variabil de nucleotide); bucla „DHU" (care conține dihidrouracil) și bucla „anticodon" *(figura 1.92, 1.93* și *1.94)*.

Capetele lanțurilor, indiferent de natura *t*-ARN, sînt identice (Ofengand, 1961):

Capătul 5'	*Capătul 3'*
P-5'-G-3'-P	P-5'-C-3'-P-5'-C-3'-P-5'-A

Capătul 5' este fosforilat, restul —5'— fiind de obicei pG; secvența bazelor din capătul 3' este CCA, cu precizarea că aminoacidul (specific) activat se atașază la grupa 3'—OH a adeninei terminale.

Scanned with OKEN Scanner

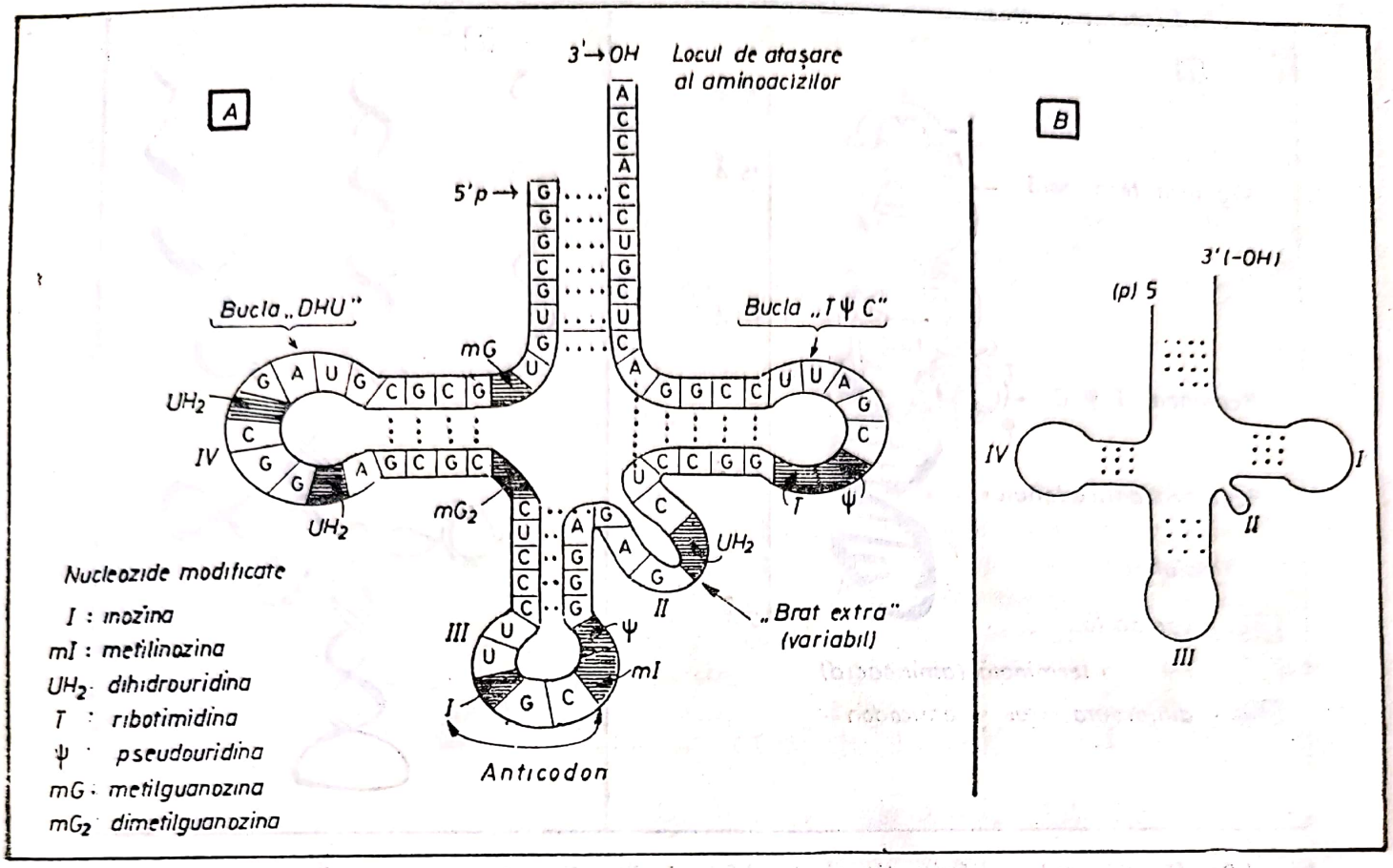


Fig. 1.92. Alanil-t-ARN (drojdie). A. Structură cu ilustrarea nucleotidelor. *B.* Reprezentare simplificată.

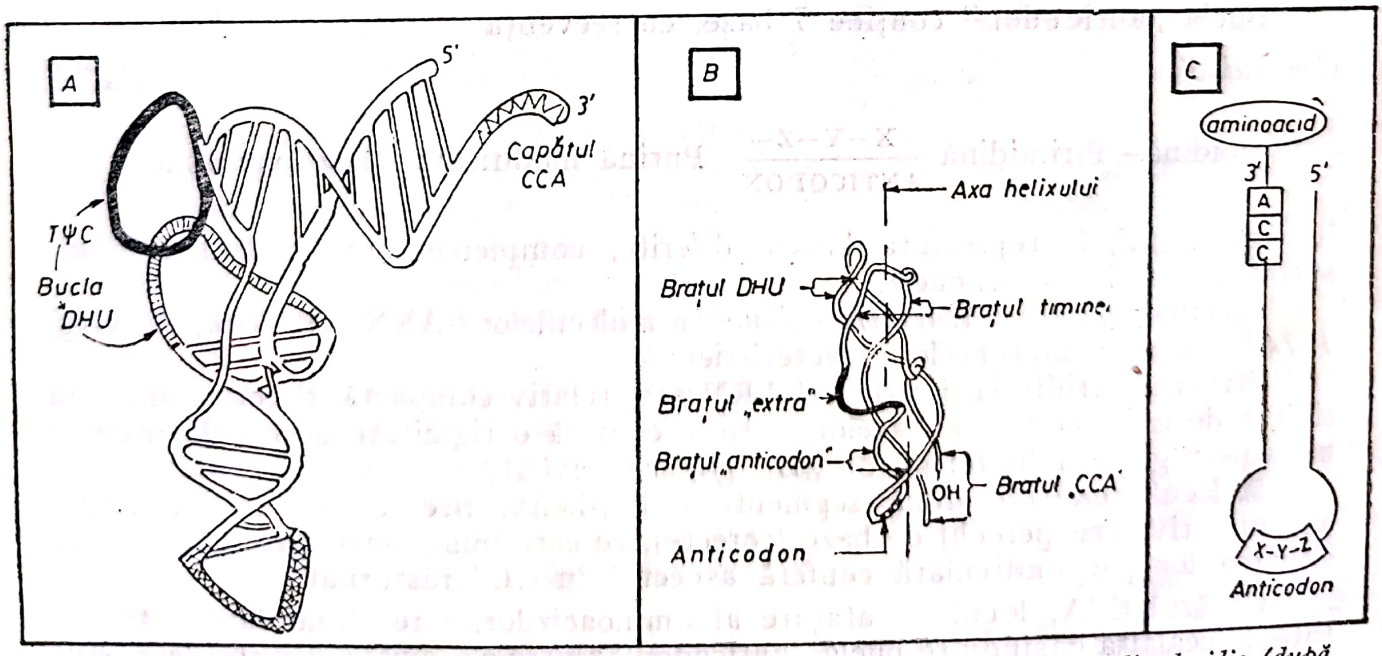


Fig. 1.93. A. Diagrama schematică a structurii tridimensionale a fenil-alanil-t-ARN din drojdie (după Sung-Hou-Kim, din L. Stryer, 1975). B. Idem *(după E. Hofmann, 1975). C. Reprezentare simplificată a t-ARN.*

Scanned with OKEN Scanner

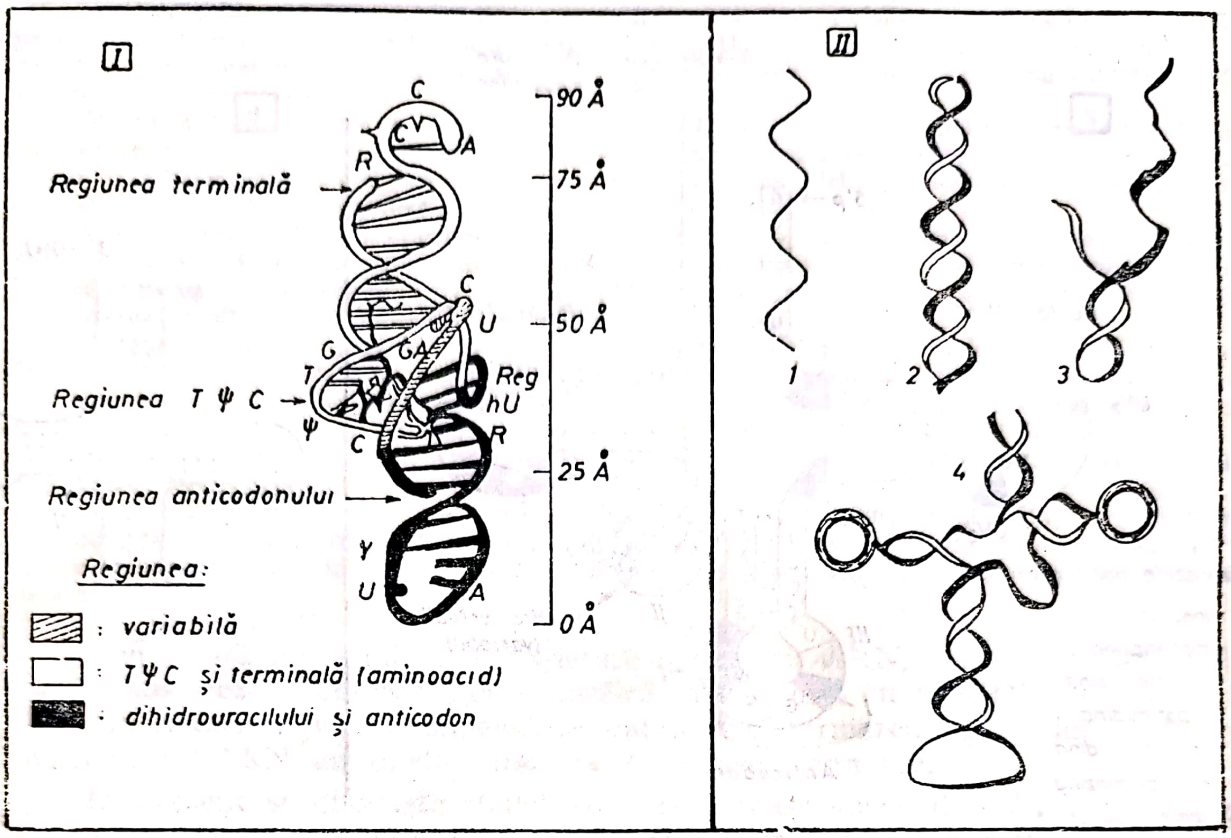


Fig. 1.94. Modele pentru diferite tipuri de ARN. **I.** ***Structura terţiară a t-ARN (după Levit, din J. P. Ebel, 1972)*** **II.** ***Reprezentări simplificate: 1.*** **mARN: monocatenă simplă; *2.* rARN: elice dublă monocatenară; *3.* rARN: monocatenă parţial helicoidală; *4.* tARN: elice monocatenară astructurată.**

Bucla „anticodon" conţine 7 baze, cu secvenţa:

Capătul 5' *Capătul 3'*

$$\text{—Pirimidină—Pirimidină} \frac{\text{X—Y—Z—}}{\text{ANTICODON}} \text{Purină modificată—Baze variabile}$$

în care X, Y, Z reprezintă bazele diferite, complementare „codonilor", care specifică diferiţii aminoacizi.

Elucidarea *structurii tridimensionale* a moleculelor *t*-ARN *(A. Rich, A. Klug, 1974)* relevă următoarele caracteristici:

Structura tridimensională a *t*-ARN este relativ compactă, datorită gradului ridicat de împerechere a bazelor, care le conferă o rigiditate destul de mare şi un aspect general în formă de „L" *(figura 1.93 A)*.

Molecula conţine două segmente dublu-helix, fiecare din acestea avînd aproximativ zece perechi de baze (corecte), ce corespund unei ture a helixului; situarea lor perpendiculară conferă aspectul în „L" răsturnat.

Capătul CCA, locul de ataşare al aminoacizilor, este situat la o extremitate, la cealaltă găsindu-se bucla „anticodon"; între ele există o distanţă destul de mare, de aproximativ 80 Å; buclele DHU şi TψC formează „colţul" literei „L".

Capătul CCA şi regiunea helicală adiacentă acţionează slab cu restul moleculei şi îşi schimbă conformaţia prin ataşarea aminoacizilor şi în cursul biosintezei proteinelor pe ribozomi.

Aceeaşi moleculă de *t*-ARN poate recunoaşte, uneori, mai mulţi codoni, deci acelaşi aminoacid să fie specificat de mai mulţi codoni, de exemplu Ala-*t*-ARN din drojdie leagă trei codoni: GCU, GCC şi GCA.

Codonii care diferă în primele două baze necesită *t*-ARN diferiţi (deci specifică aminoacizi diferiţi); a treia bază poate varia pentru *t*-ARN care leagă acelaşi aminoacid, ca în cazul precedent: U, C sau A *(L. Stryer, 1975; D. Bedeleanu, 1969)*.

1.3.6.6.1.2. ARN ribozomal (*r*-ARN) şi viral

Fibrele de ARN prezintă în difracţia cu raze X o cristalinitate mică şi oferă puţine detalii pentru interpretarea structurilor moleculare, imaginile fiind similare pentru ARN de origini diferite. În soluţie, proprietăţile lor sînt puternic influenţate de *t*° şi concentraţie. La *t*° ridicate şi concentraţii foarte scăzute tind să formeze gheme răsucite la întîmplare; la *t*° camerei şi concentraţii ionice moderate, soluţiile de ARN conţin, probabil, 40—60% regiuni helicale, dar mai puţin stabile şi cu legături mai puţin specifice decît ADN, aşa cum sugerează *t*° de tranziţie mai mică a ARN, de 50—60°C, faţă de 80—90°C pentru ADN.

Poliribonucleotidele sintetice, obţinute pe cale enzimatică, relevă că lanţurile lor pot forma structuri dublu- şi triplu-helicale, prin legăturile de H ale bazelor complementare, unele antiparalele, cu 10 nucleotide pe tură, similare cu ADN. Din considerarea funcţiilor ADN şi ARN se admite existenţa reală în celulă a unor *hibrizi*, de exemplu a helixului format din poli-desoxiribo-G şi poli-ribo-C, identificat prin absorbţia în U.V.

ARN VIRAL, din virusul mozaicului tutunului: *TMV-ARN (figura 1.95)* apare *in situ* sub forma de cilindri cu Ø de 180 Å şi lungimea de 3.000 Å (complet întins are lungimea de 5 mμ). Este alcătuit dintr-un monolanţ de 6.390 nucleotide (40 pe tură), „cuibărite" într-un pat format din 2.130 „unităţi" proteice, care îl fac inaccesibil atacului ribonucleazelor. Fiecare „unitate" proteică este alcătuită din 158 aminoacizi (cu secvenţa cunoscută), şi greut. mol. de 15.500, şi interacţionează cu 3 nucleotide. TMV-ARN conţine deci 6.390 nucleotide şi aproximativ 340.000 resturi de aminoacizi şi are greut. mol. totală de $40 \cdot 10^6$ *(Anderer, 1960; Tsugito, 1960)*.

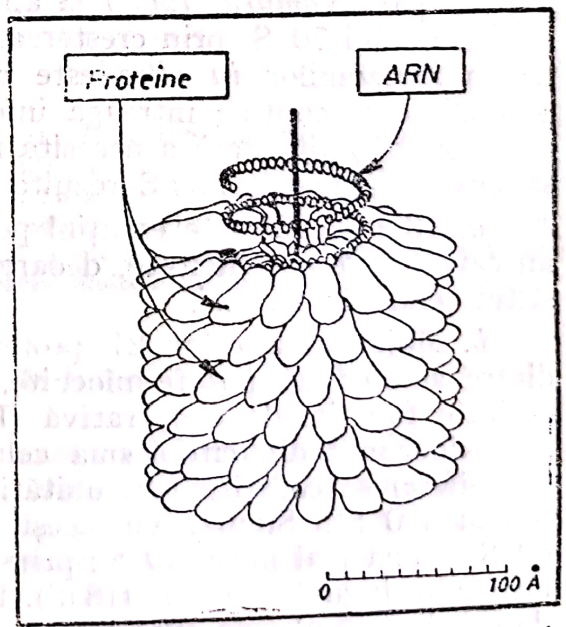


Fig. 1.95. Organizarea ARN virusului mozaicului tutunului (după Klug şi Caspar, din D. Bedeleanu, 1969).

Virusul mozaicului tutunului (TMV) poate fi disociat în ARN şi proteine, de exemplu, cu acid acetic glacial; ARN

disociat (izolat) este foarte labil, în timp ce TMV își păstrează caracterul de infectivitate timp de ani de zile. Subunitățile proteice din TMV nu sînt legate covalent între ele și împreună cu ARN; în condiții adecvate, se reasociază spontan în particule virusale identice ca structură și infectivitate cu cele originale *(H. Fraenkel—Conrat, R. Williams, 1955)*. Acesta este primul exemplu al unei *autoasamblări a structurii biologice*, definită ca „un proces în care componenții se asociază spontan, în condiții corespunzătoare de mediu, pentru a forma o structură specifică" *(L. Stryer, 1975)*.

În absența ARN, subunitățile proteice se asociază formînd structuri diferite, condiționate de pH, tăria ionică, temperatură. Legarea ARN asigură o energie liberă capabilă să învingă repulsiile electrostatice ale grupărilor carboxilice ale subunităților proteice și determină refacerea virusului TMV original.

ARN RIBOZOMAL *(r-ARN)*. Ribozomii au surprins, de la început, prin asemănarea lor cu virușii mici, dar s-au remarcat și unele diferențe: virușii conțin de obicei proteine, în timp ce ribozomii bacterieni sînt alcătuiți în majoritate din ARN și din această cauză au o altă structură și conformație. Ei au fost descriși la plante de *Luria (1943)* și la mamifere, unde sînt atașați de reticulul endoplasmatic rugos, de către compatriotul nostru, laureat al premiului Nobel, *George Palade (1953)*. În culturile de *E. coli*, în creștere exponențială, ribozomii reprezintă aprox. 30% din greutatea uscată și sînt alcătuiți din 63% ARN și 37% proteine. Ribozomii apar în stări diferite de asociere, în dependență de origine, pH, concentrația ionilor Mg^{2+} etc.

Unitate de ribozomi 70 S din bacterii (greut. mol. $2{,}5 \times 10^6$ și Ø200 Å) se disociază în două subunități: una mai mare, *50 S*, cu formă aproape sferică (140/170 Å), alcătuită dintr-o moleculă de ARN 23 S (greut. mol. $1{,}1 \times 10^6$), ARN 5 S (greut. mol. 4×10^4) și aproximativ 35 proteine și una mai mică, *30 S*, cu formă elipsoidă asimetrică (90/170 Å), formată dintr-o moleculă de ARN 16 S (greut. mol. $5{,}6 \times 10^5$) și 21 de proteine *(figura 1.96)*.

Reconstituirea subunității ribozomale 30 S din 16 S ARN și proteinele respective *(M. Nomura, 1968)* și apoi, similar, a subunității 50 S și din acestea a ribozomului 70 S, prin creșterea concentrației ionilor de Mg^{2+}, relevă că formarea ribozomilor *in vitro* este un proces de autoasamblare („self-assembly proces") care conține întreaga informație necesară pentru asamblarea corectă a acestor organite, fără a necesita factori nonribozomali. Din studiile de reconstituire a subunității 30 S rezultă următoarele caracteristici:

a. 16 S—ARN este esențial pentru asamblare și funcțiile sale și manifestă un caracter de specificitate, deoarece 16 S—ARN din drojdie nu se poate substitui celui din *E. coli*.

b. Majoritatea celor 21 proteine sînt necesare, pe lîngă 16 S—ARN; 6 dintre acestea nu pot fi înlocuite, ceea ce denotă că subunitatea 30 S este o entitate funcțională cooperativă (L. Stryer, 1975).

Ribozomii din citoplasma celulelor eucariotelor și respectiv a animalelor (mamifere) se constituie în unități de ribozomi *80 S*, mai mari decît cei bacterieni (70 S). Similar cu aceștia, ei disociază într-o subunitate mai mare, *60 S* și una mai mică, *40 S*; prima conține 3 molecule de ARN (28; 7 și 5 S), ultima, o singură moleculă (18 S). Ribozomii din mitocondrii și cloroplaste diferă de cei din citoplasma eucariotelor, asemănîndu-se mai mult cu particulele 70 S (din bacterii) decît cu cele 80 S, ceea ce sugerează un grad de similitudine ridicat între biosinteza proteinelor din mitocondrii, cloroplaste și bacterii.

Scanned with OKEN Scanner

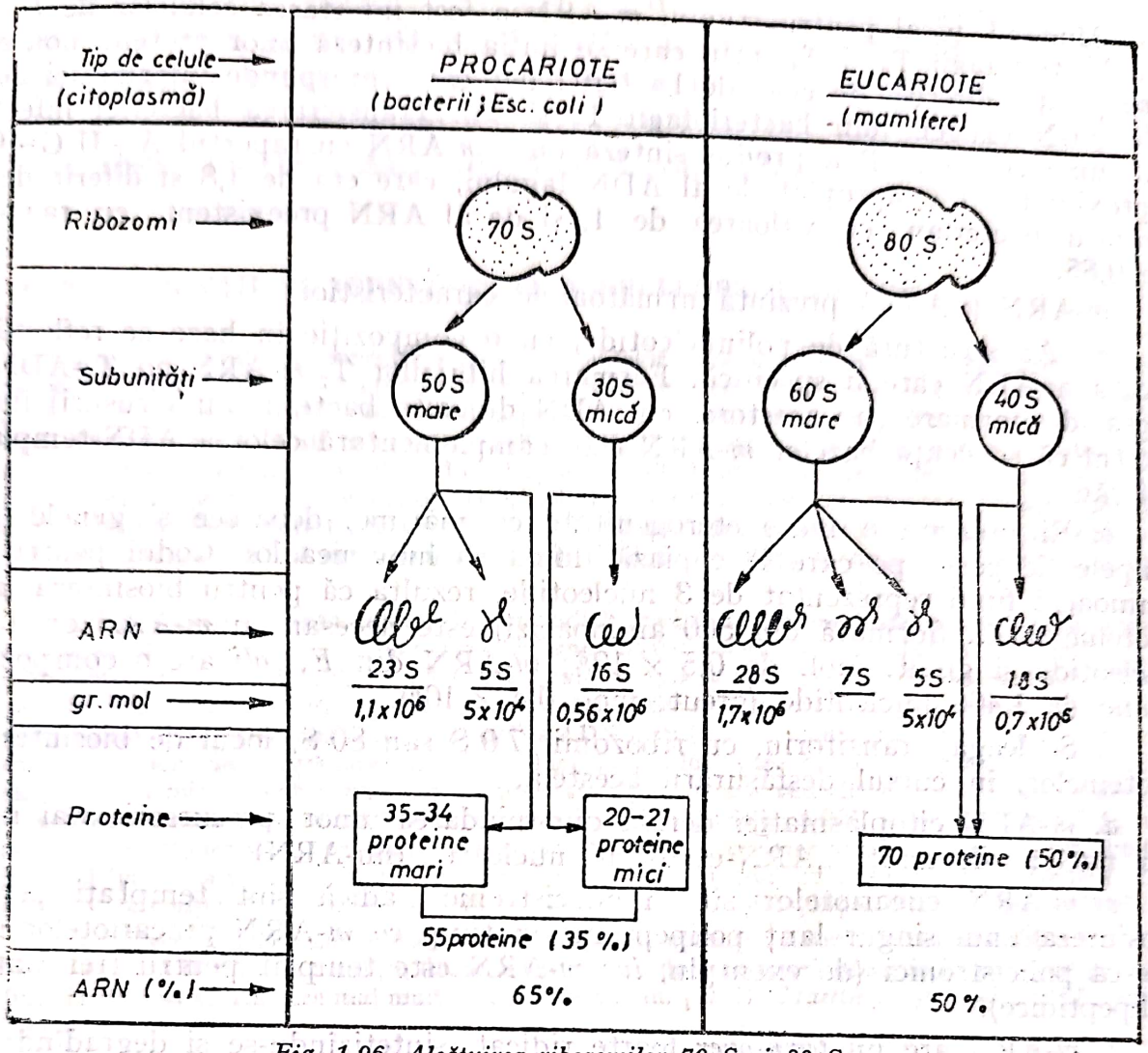


Fig. 1.96. Alcătuirea ribozomilor 70 S și 80 S.

În scopul stabilirii în ce măsură moleculele de *r*-ARN și *t*-ARN sînt sintetizate pe templații ADN s-a aplicat metoda hibrizilor „ADN-ARN" și tehnica filtrului de nitroceluloză, care reține ADN dublu-helix și hibrizii și lasă să treacă ARN-monolanț, constatîndu-se că în cazul adăugării ARN din *E.coli* și respectiv a ADN (marcați cu ^{32}P), măsurarea radioactivității reținută pe filtru indică formarea hibrizilor „ADN-ARN" atît cu *r*-ARN (5; 16 și 23 S) cît și cu *t*-ARN și faptul că genomul *E.coli* posedă secvențele complementare pentru specificarea moleculelor de ARN.

1.3.6.6.1.3. ARN mesager (*m*-ARN) sau de informație (*i*-ARN)

Observația că infectarea celulei bacteriene cu virusuri detemină sinteza imediată a unui tip diferit de ARN *(Volchin, Astrachan, 1954)* și considerațiile teoretice care susțineau necesitatea unui mesager al informației din nucleu în citoplasmă, a cărui caracteristici au fost aproape în totalitate prevăzute aprioric *(Monod, Jacob, 1961)* s-a finalizat în descoperirea *m*-ARN. Acest tip de ARN reprezintă 2—4% din totalitatea ARN celular, cu rolul general, în toate celulele, de mesager al informației ADN cromozomial și este caracterizat printr-o viață foarte scurtă (de cîteva minute) și prin faptul că o moleculă de *m*-ARN determină biosinteza unei singure molecule de proteină.

Modelul ideal pentru studiul *m*-ARN a fost infectarea celulelor de *E. coli* cu bacteriofagii T_2 și T_4, prin care se inițiia biosinteza unor proteine noi, cu o compoziție diferită de cele ale bacteriei dar care corespunde informației aduse de ADN exogen (din bacteriofagii T_2 și T_4). Transferarea bacteriei infectate într-un mediu cu ^{32}P a produs sinteza unui *m*-ARN cu raportul A+U/G+C de aproximativ 1,7, apropiat de al ADN fagului, care era de 1,8 și diferit de cel propriu bacterian, cu valoarea de 1, și de al ARN preexistent, cu raportul de 0,85.

m-ARN (*i*-ARN) prezintă următoarele caracteristici:

a. Au structură de polinucleotide, cu o compoziție în baze ce reflectă pe aceea a ADN care îi specifică. Formarea hibrizilor T_2-*m*-ARN cu T_2-ADN (și lipsa de formare a acestora cu ADN din alte bacterii sau virusuri) indică faptul că secvența bazelor *m*-ARN este complementară celor a ADN-templatului său.

b. Ei prezintă o mare eterogenitate ca mărime, deoarece și genele (sau grupele de gene) pe care le copiază diferă în lungimea lor. Codul pentru un aminoacid fiind reprezentat de 3 nucleotide, rezultă că pentru biosinteza unei proteine medii (formată din 500 aminoacizi) este necesar un *m*-ARN cu 1500 nucleotide și greut. mol. de $0,5 \times 10^6$; *m*-ARN din *E. coli* are o compoziție medie de 1.400 nucleotide (greut. mol. $0,4 \times 10^6$).

c. Se leagă, tranzitoriu, cu ribozomii 70 S sau 80 S, locul de biosinteză a proteinelor, în cursul desfășurării acesteia.

d. m-ARN citoplasmatici derivă din scindarea unor precursori mai mari din nucleu, denumiți „ARN-eterogeni nucleari" (hn-ARN)

e. m-ARN eucariotelor sînt monocistronici, adică sînt templați pentru biosinteza unui singur lanț polipeptidic, în timp ce *m*-ARN procariotelor sînt adesea policistronici (de exemplu, *lac m*-ARN este templat pentru trei lanțuri polipeptidice).

f. m-ARN are un *turn-over* foarte ridicat, sintetizîndu-se și degradîndu-se foarte rapid, fapt confirmat de constatarea că 5-FU se încorporează în cîteva minute în *m*-ARN.

g. Formarea rapidă a *m*-ARN și consumarea unei molecule pentru biosinteza unei anumite proteine relevă rolul evident de mesager al informației și eficiența sa în producerea proteinelor (inclusiv a enzimelor) în raport de necesitățile celulei.

1.3.6.7. *NUCLEOPROTEIDELE*

Datorită caracterului acid (polianioniți), acizii nucleici se leagă, *in vivo*, mai ales cu *proteinele bazice*, din grupa protaminelor (care predomină în spermatozoizii peștilor) sau din grupa histonelor (în celulele somatice ale tuturor animalelor, în special ca dezoxinucleoproteide). Unirea celor două componente se face prin legături de tip salin (ion-ion) între resturile acide fosfatice din acizii nucleici și grupările bazice $-NH_3^+$ din proteine. Existența nucleoproteidelor în structura cărora intră proteine neutre (Belozerski) sugerează, în aceste cazuri, legături labile (care se rup prin fierbere cu NaCl 10%), probabil de tip „dipol-dipol" sau legături de H.

Scanned with OKEN Scanner

Proporţia acizilor nucleici este diferită, de exemplu, nucleoprotaminele din sperma unor peşti conţin 63—65% ADN; nucleohistonele: 40—50% ADN; nucleoproteidele din virusul mozaicului tutunului au 6—7% ARN; cele din „petele circulare" ale tutunului 40—41% ARN iar cele ale plantelor producătoare de roşii: 16—18% ARN (după *S. Zincă, 1971*).

1.3.6.7.1. REACŢII DE IDENTIFICARE A NUCLEOPROTEIDELOR

Localizarea ADN-ului şi respectiv a nucleoproteidelor în celule şi ţesuturi (în creştere) se poate aprecia prin reacţia Feulghen. Secţiunile se supun hidrolizei cu fuxină bazică decolorată cu sulfit: în prezenţa dezoxiribozei (dR) din ADN se produce o coloraţie roşie-purpurie, care nu este dată de riboză (R) din ARN. Unii coloranţi bazici, de tipul albastrului de metilen sau hematoxilinei, colorează atît nucleii cît şi particulele din citoplasmă, fiind adsorbiţi de ambii acizi nucleici. Alţi coloranţi bazici au proprietăţi metacromatice, colorînd acizii nucleici în albastru şi alţi compuşi, în special polizaharidele sulfatate, în roşu purpuriu. Cel mai utilizat colorant din această grupă este albastrul de toluidină, a cărui metacromazie se corelează cu tendinţa sa de polimerizare (cu schimbarea culorii).

Un interes special prezintă coloranţii care indică gradul de polimerizare al nucleoproteinelor, respectiv al acizilor nucleici. Astfel, pironina (colorant bazic) colorează ARN dar nu colorează ADN nativ. Mecanismul reacţiei relevă că ARN din celulă se găsesc într-un grad de polimerizare (redus) care permite adsorbţia colorantului, în timp ce ADN nativ are un grad de polimerizare prea mare şi nu este colorat. Prin depolimerizarea (parţială) a ADN se ajunge la compuşi cu grad de polimerizare convenabil colorării, dar degradarea ARN conduce la produşi care nu se mai colorează din cauza gradului lor prea mic de polimerizare. O comportare opusă o are verdele de metil, care colorează numai macromoleculele cu grad înalt de polimerizare, ca de exemplu, ADN, şi nu le colorează pe cele cu grad mic de polimerizare, cum sînt ARN şi ADN parţial depolimerizat. Prin combinarea acestor doi coloranţi (pironină-verde de metil, colorantul Unna-Pappenheim) se colorează atît granulele citoplasmatice, care conţin ARN (albastru), cît şi ADN nuclear (verde) (după *W.S. Hoffman, 1970*).

Pentru dozarea acizilor nucleici se folosesc metodele curente: determinarea absorbţiei în U.V., dozarea P eliberat în diferite condiţii, dozarea ribozei sau dezoxiribozei, dozarea bazelor componente etc., fiind indicat să se utilizeze mai multe metode simultan. *(D. W. Martin Jr. şi colab., 1983.; Rawn J. D. 1983)*.

1.3.7. METALOPROTEIDE

Multe proteine conţin legate metale [Fe, Cu, Zn etc.]. Ele participă în transportul şi formele de depozitare ale metalelor, în structurarea polimerilor sau în partea activă a enzimelor.

Pentru elucidarea structurii metaloproteidelor se utilizează metode fizice şi chimice. Deplasarea metalului din legăturile sale cu proteina se face prin dializă, complexare, titrări potenţiometrice etc.; unele din aceste metode indică şi nivelul forţei de legare a metalului. Metodele fizice-spectrofotometria, rezonanţa de spin şi altele- aplicate în paralel cu cele chimice, permit aprofundarea informaţiilor din acest domeniu, în care însă multe aspecte sînt incomplet elucidate. Complexul metal-proteină se caracterizează prin *stabilitatea sa*, interpretată termodinamic dar şi cinetic, deoarece pentru multe metaloproteide se realizează deplasarea metalului printr-o disociere reversibilă, condiţie în care se aplică legea maselor.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.7.1. *EXEMPLE DE METALOPROTEIDE*

1.3.7.1.1. PROTEINE CU FIER

Cele mai cunoscute sînt *transferina* (din serul sanguin), *ovotransferina* sau *conalbumina* (din albușul de ou) și *lactotransferina* (din lapte). Transferina și conalbumina conțin cîte două locuri unde se leagă ionii metalici; primul ion Fe^{3+} este legat puternic, în timp ce al doilea este mai slab legat și poate fi Cu^{2+} sau Zn^{2+}, studiile recente dovedind o mare asemănare între proteinele acestor două feriproteide. În lactotransferină, proteina conține 27 resturi bazice, dar nu conține grupări —SH. *Feritina* conține —FeOOH, împreună cu fosfat, legate de *apoferitină*, proteina lipsită de fier, cu greut. mol. 480.000. Din numeroasele enzime, *feredoxina*, enzimă de oxido-reducere cu greut. mol. mică, de la unele plante (cloroplaste) sau bacterii, *xantinoxidaza*, *colindehidrogenaza*, *α-glicerofosfat-dehidrogenaza*, *succindehidrogenaza*, sînt cîteva care conțin fier.

1.3.7.1.2. PROTEINE CU CUPRU

Hemocianinele îndeplinesc rolul de pigmenți respiratori la unele nevertebrate (crustacee, moluște) sub formă dizolvată în plasmă. Au un conținut diferit în Cu^{2+} și greut. mol. diferite: 550.000 la crap; 710.000 la caracatiță; 8.900.000 la melcul Helix și 6.800.000 la melcul Buscion. Formele oxidate sînt albastru-violete (la melci) și albastre-verzi (la caracatiță); formele reduse sînt brune. Cuprul se detașază prin simplă dializă față de apa acidulată.

Ceruloplasmina conține 8 atomi de cupru pe moleculă, jumătate Cu^{2+}, jumătate Cu^{1+}, legați de aminoacizi, ca His, Liz, Tir. Are greut. mol. de 151.000 (0,34% Cu), cu rol de vehicul al cuprului în sînge și cu acțiune oxidazică asupra acidului ascorbic (vitamina C).

Azurina, similară ceruloplasminei, se găsește în unele bacterii *(Bordetella, Pseudomonas aeruginose)*. Dintre *enzimele* cu cupru se pot cita: *lacaza*, *tirozinaza*, *citocromoxidaza*, *ascorbicoxidaza*, *monoaminooxidaza (MAO)*, *uricaza* etc.

1.3.7.1.3. PROTEINE CU ZINC

Zincul apare în structura unor *enzime*; *carbonicoanhidraza* (un ion Zn^{2+}/moleculă, legat de o grupare —SH și detașabil prin cianuri, sulfonamide), *carboxipeptidaze*, *fosfataze alcaline*, *unele dehidrogenaze* și în *insulină* (hormon).

1.3.7.1.4. PROTEINE CU ALTE METALE

Proteine cu nichel, cobalt apar, în special, în grupa enzimelor. Uneori metalele se pot schimba între ele fără modificarea activității; alteori asemenea schimbări produc modificarea tipului de activitate sau inactivarea enzimelor.

Asupra rolului metalelor și metaloproteinelor se va reveni în alte capitole.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.8. HEMOPROTEIDE

Tranziția de la viața anaerobă la cea aerobă a însemnat un pas major în evoluție, permițînd valorificarea unui bogat rezervor energetic; de exemplu, metabolizarea glucozei pune în libertate de 18 ori mai multă energie în prezența oxigenului decît în lipsa acestuia. În consecință, s-au dezvoltat la vertebrate două mecanisme principale pentru aprovizionarea celulelor cu un flux adecvat de oxigen:

Sistemul circulator, care oferă activ oxigenul celulelor; în absența acestuia dimensiunile unui organism aerob sînt limitate la cîțiva mm, deoarece difuzia O_2 pe spații mai extinse nu poate asigura necesitățile celulei.

Apariția unor molecule transportoare de oxigen, care să învingă limitele impuse de solubilitatea mică a acestuia. Asemenea transportori sînt hemoproteidele, alcătuite dintr-o parte prostetică, *gruparea hem,* care le conferă și culoarea caracteristică (cromoproteide) și o parte proteică, *apoproteina,* de natură globinică. Hemoglobina (Hb), conținută în globulele roșii, crește capacitatea de transport a oxigenului din sînge de la 5 la 250 ml O_2/litru și concomitent joacă un rol esențial în transportul CO_2 și H^+. Mioglobina (Mb), localizată în mușchi, servește ca depozit și rezervor al oxigenului și îi facilitează difuzia în țesuturi. Prin similitudinea părții prostetice se pot încadra aici și *citocromii.*

Cercetările asupra structurii hemoglobinei, inițiate de peste un secol *(Nencki, Teichmann, Küster, Willstätter, H. Fischer),* au condus la elucidarea, în ultimele două decenii, a naturii părții proteice și a arhitecturii spațiale complexe a mioglobinei și hemoglobinei *(Ingram, Kendrew, Perutz etc.).* Recent s-a elaborat o schemă cibernetică integrativă a homeostaziei oxigenului *(I. Baciu, O. Aramă, 1980).*

1.3.8.1. *PORFIRINELE*

Porfina reprezintă o structură ipotetică de bază ($C_{20}H_{14}N_4$), alcătuită din patru nuclee pirolice (notate cu I—IV sau A—D), unite între ele prin patru grupări metenice „—CH=" (notate α, β, γ, δ) *(figura 1.97 B).*

În compușii naturali, o parte, sau toți cei 8 H (notați 1—8) sînt înlocuiți cu radicali, ca de exemplu *M*=metil=$-CH_3$; E=etil=$-C_2H_5$; Pr=propionil =$-CH_2-CH_2-COOH$; Ac=acetil=$-CH_2-COOH$; V=vinil=$-CH=CH_2$, conducînd astfel la *porfirine,* compuși cu 11 duble legături, notați cu sufixul „-ină" *(figura 1.97 B);* în biosinteză aceștia sînt precedați de *porfirinogeni,* cu 8 duble legături, notați cu sufixul „-geni" *(figura 1.97 A).*

Izomeria porfirinelor. În cazul cînd există doi substituenți diferiți, *a* și *b,* apar patru tipuri de izomerie, notate cu I—IV; cînd există trei substituenți diferiți, *a, b, c,* numărul izomerilor crește (H. Fischer menționează 15 asemenea izomeri, notați cu I—XV). Principalele tipuri de izomerie sînt ilustrate în *tabelul 1.38 A* și exemplificate pentru tipul III și IX într-o schemă simplificată care indică numai substituenții din pozițiile 1—8 *(figura 1.97 C).*

Izomerii cei mai importanți în organismul uman sînt de tip III și în cantități mai mici cei de tip I. După *natura substituenților* apar o serie de porfirine, respectiv porfirinogeni, denumite cu prefixe caracteristice: *uro-, copro-, etio-,*

Scanned with OKEN Scanner

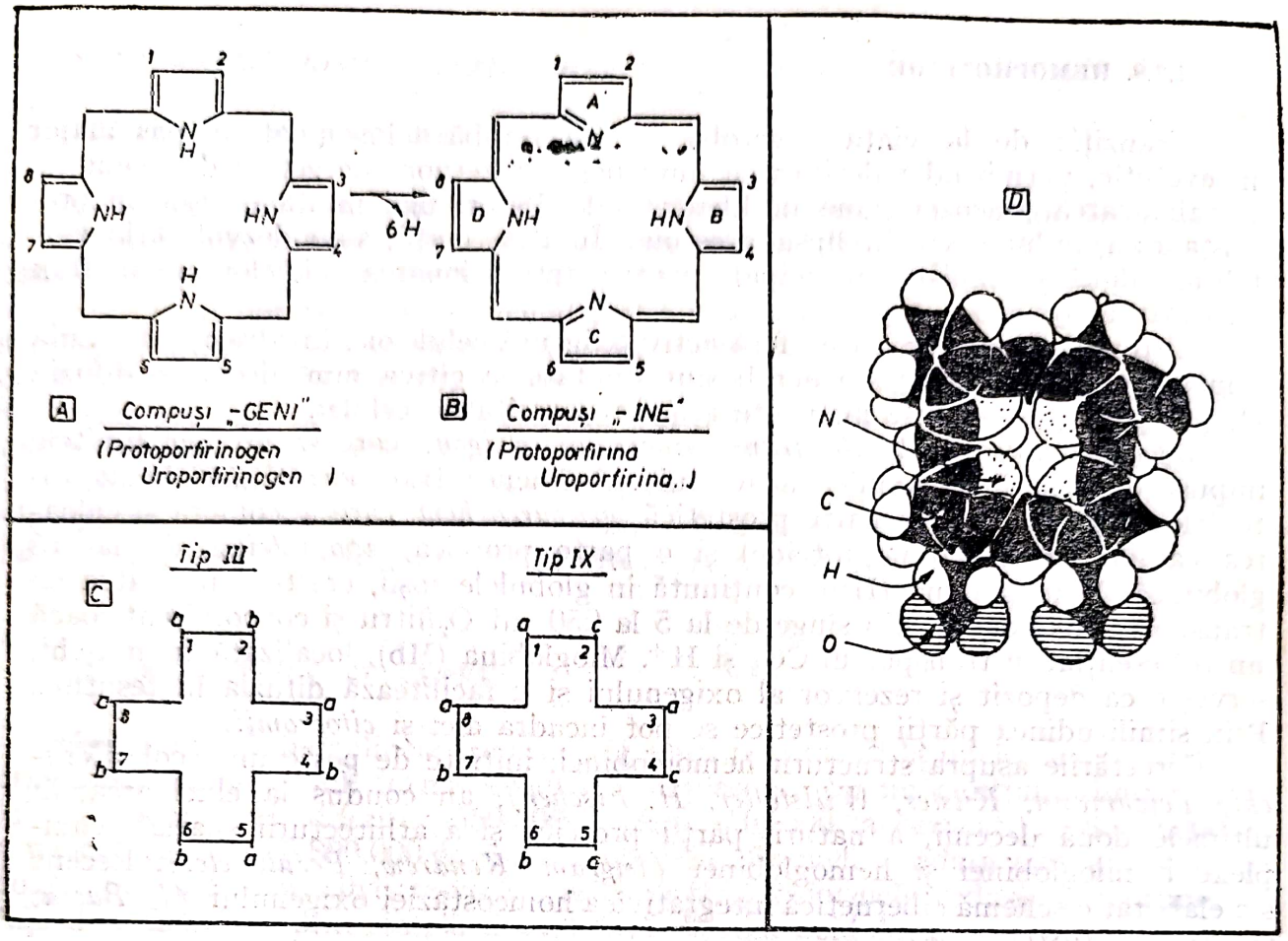


Fig. 1.97. Structura porfirinogenilor (A), porfirinelor (B), reprezentarea simplificată (C) (a se vedea Tabelul nr. 1.38) și modelul „compact" al protoporfirinei IX (D).

TABELUL 1.38

Tipuri de izomerie și de substituție ale porfirinelor

A. *TIPURI DE IZOMERIE*			
— *2 substituenți :*			
Tip :	*a*	*b*	
I	1,3,5,7	2,4,6,8	
II	1,4,5,8	2,3,6,7	
III	*1,3,5,8*	*2,4,6,7*	
IV	1,4,6,7	2,3,5,8	
— *3 substituenți*		c	b
IX	1,3,5,8	2,4	6,7

B. *TIPURI DE SUBSTITUȚIE*			
Denumire	*Substituenți :*		
	a	*b*	
URO-	Ac.	Pr.	
COPRO-	M.	Pr.	
ETIO-	M.	E.	
		b	c
DEUTERO-	M	Pr.	H
PROTO-	M	Pr.	V

deutero-, proto-, (tabelul 1.38 B) ; fiecare dintre acești compuși aparțin unui tip de izomerie bine definit. Astfel, *etioporfirinele* au patru grupe M și 4 grupe E : etioporfirina de tip I este 1,3,5,7-tetrametil-2,4,6,8-tetraetil-porfina, iar cea de tip III este 1,3,5,8-tetrametil-2,4,6,7-tetraetil-porfina. În mod similar, *coproporfirinele* au 4 grupări M și 4 grupări Pr ; *uroporfirinele*, 4 grupări Ac și 4 Pr ;

Scanned with OKEN Scanner

deuteroporfirinele, 4 grupări M, 2 grupări Pr şi 2 H neînlocuiţi. În toate aceste cazuri, structura de bază are 11 duble legături (porfirine); dacă au 8 duble legături apar porfirinogenii corespunzători: etioporfirinogen, uroporfirinogen etc.

Dintre izomerii cu trei substituenţi cel mai important este *protoporfirina de tip IX*, care derivă din tipul III, deoarece are substituentul *a*, reprezentat prin *M*, situat în poziţiile 1,3,5,8 (la fel ca în tipul III); al doilea substituent este Pr (în 6 şi 7) şi al treilea V (provenit în cursul metabolizării prin decarboxilarea, urmată de oxidare, a două resturi Pr din 2 şi 4). Protoporfirina IX este deci: 1,3,5,8-tetrametil-2,4-divinil-6,7-dipropionilporfina, şi prezintă un interes deosebit deoarece intră în structura părţii prostetice a Mb, Hb, citocromului *c* şi a clorofilei (sub formă modificată).

În privinţa caracterizării şi nomenclaturii sînt de reţinut următoarele: nucleul de bază, tetrapirolic, legat prin patru grupări $-CH_2-$ şi cu 8 duble legături, se notează cu sufixul „*-gen*", iar cel cu patru legături $-CH=$ şi 11 duble legături cu sufixul „*-ină*"; natura substituenţilor din poziţiile 1—8 se notează cu prefixe, de exemplu, *uro-*, *copro-* *etio-* etc.; tipul de izomerie, în cazul a doi substituenţi diferiţi, se indică prin cifrele I—IV; pentru tipurile de izomerie cu trei substituenţi se folosesc cifrele în continuare (V—XV); dintre aceştia este de interes tipul IX (cu substituenţi *a* în 1,3,5,8, *b* în 6 şi 7 şi *c* în 2 şi 4), folosind prefixul „proto-" pentru compusul 1,3,5,8-tetra-M, 6,7-di-Pr-2,6 di-V. Diferitele porfirine au în organism atît un metabolism propriu, cît şi, mai ales, sub formă legată cu fierul şi proteinele: Mb, Hb etc.

1.3.8.2. *HEMI. HEMINE*

Prin legarea în centrul protoporfirinei IX a unui Fe^{2+} se obţine *protohemul* sau *hemul (figura 1.98)*, iar dacă se leagă Fe^{3+} se obţine *hemina* sau *hematina*.

Cele şase legături ale fierului sînt îndreptate către vîrfurile unui octaedru regulat. Dintre acestea, patru se găsesc în acelaşi plan şi se leagă cu cei patru atomi de N ai pirolilor din protoporfirină; celelalte două, denumite şi poziţiile 5 şi 6 de coordinare, se situează perpendicular, una deasupra şi alta sub

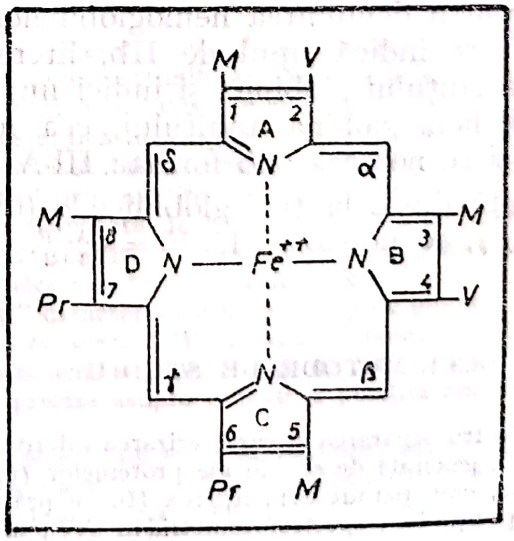


Fig. 1.98. Protohem (hem): 1, 3, 5, 8-tetrametil (M = $-CH_3$) — 2,4-divinil (V = $-CH=CH_2$) —6,7-dipropionic (Pr = $-CH_2-CH_2-COOH$) — protoporfirina IX—Fe^{2+}.

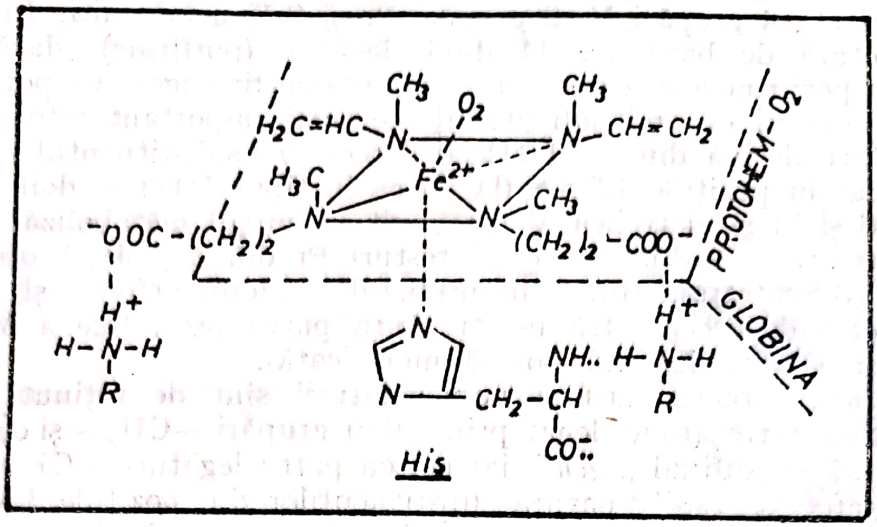


Fig. 1.99. Legarea Fe^{2+} în oxihemoglobină

plan *(figura 1.99)*. În mioglobină și respectiv hemoglobină, una din acestea se leagă de un aminoaicd din lanțul proteic (globină), iar cealaltă servește pentru legarea O_2 (HbO_2), CO (HbCO) sau a apei.

Pentru compușii cu starea de oxidare Fe^{2+} legați cu globina se folosesc denumirile de ferohemoglobine (respectiv ferromioglobine), iar pentru cei cu Fe^{3+}, denumirile de ferrihemoglobine sau methemoglobine, (respectiv ferrimioglobine).

1.3.8.3. *MIOGLOBINE (Mb). HEMOGLOBINE (Hb)*

Mioglobina (Mb) este alcătuită dintr-un hem și un lanț polipeptidic, tip globină (gr. mol. 17.800). *Hemoglobina* (Hb) este un tetramer (gr. mol. 66.000) alcătuit din asamblarea a patru subunități, fiecare formată dintr-un hem și cîte un lanț de globină. Partea proteică este reprezentată, de obicei, prin două perechi de lanțuri identice, α și respectiv β; în unele tipuri de Hb pot apare și alte lanțuri (γ, δ etc.).

Pentru denumirea hemoglobinelor se utilizează literele mari ale alfabetului latin care indică tipul de Hb, literele mici ale alfabetului grec, care definesc natura lanțului globinic, și indici numerici, care arată numărul lor în tetramer. Astfel, hemoglobina adultului, cea mai răspîndită la om, conține 2 lanțuri α și 2β și se notează sub forma: $HbA = \alpha_2^A\beta_2^A$ (sau 2α, 2β); hemoglobina fetală, alcătuită din 2 lanțuri globinice α (identice cu cele din HbA) și 2 lanțuri specifice, γ, se notează: $HbF = \alpha_2^A\gamma_2^F$.

1.3.8.3.1. METODE DE STUDIU

Pentru separarea și caracterizarea diferitelor mioglobine (Mb) și hemoglobine (Hb) se utilizează metodele generale de studiu ale proteinelor *(vezi 1.3.3.)*; electroforeza și cromatografia, în diferite variante, care permit evidențierea Hb ce prezintă deosebiri în încărcarea lor electrică și respectiv în compoziția lor; spectrofotometria în U.V., indică prezența unor aminoacizi cu absorbție specifică

(Trp la 290 nm); maximele spectrelor de absorbţie permit caracterizarea porfirinelor, Hb şi derivaţilor acestora *(tabelul 1.39)*. Alte metode, de exemplu, forma cristalelor, sensibilitatea la alcalii, comportamentul faţă de enzime, conţinutul în aminoacizi cu sulf etc., au servit la stabilirea unor diferenţe intraspecii şi chiar la aceeaşi specie.

TABELUL 1.39

Spectrele de absorbţie ale hemoglobinei şi compuşilor înrudiţi

DENUMIREA COMPUSULUI	MAXIMELE DE ABSORBŢIE (în mμ)				
HEMOGLOBINA	*265*				
Oxihemoglobina	514	544	576	640	
Carboxihemoglobina	535	570			
Methemoglobina	500	540	578	634	
Cianmethemoglobina	414	540			
Oximioglobina	418	542			
Carboximioglobina	428	540			
Sulfhemoglobina		540	578	618	
Verdohemoglobina				624	
Hematoporfirina	508	524	548	572	593
Protoporfirina (IX)			557	582	602
Uroporfirina I şi III	511	526	553	577	597
Coproporfirina I şi III		550	574	593	

O metodă specifică foloseşte proprietatea Hb-tetramer de a disocia asimetric, în două părţi diferite, la pH acid şi de a se reasocia la pH neutru:

$$\alpha_2^A \beta_2^A \underset{pH\ 7}{\overset{pH\ 4}{\rightleftharpoons}} \alpha_2^A + \beta_2^A$$

Amestecînd două hemoglobine, cu perechile de lanţuri diferite, de exemplu, HbS ($\alpha_2^A\beta_2^S$) şi HbI ($\alpha_2^I\beta_2^A$) se obţin, prin disociere, cele patru tipuri de lanţuri; prin reasociere, conform regulii combinărilor, se formează patru hemoglobine, dintre care două sînt identice cu cele iniţiale şi două diferite (una dintre acestea este, în cazul de faţă, chiar HbA normală):

$$\underbrace{\alpha_2^I \beta_2^A + \alpha_2^A \beta_2^S}_{\text{Hb originare}} \underset{pH\ 7}{\overset{pH\ 4}{\rightleftharpoons}} \alpha_2^I + \beta_2^I + \alpha_2^A + \beta_2^S \underset{pH\ 7}{\overset{pH\ 4}{\rightleftharpoons}} \underbrace{\alpha_2^A \beta_2^A + \alpha_2^I \beta_2^S}_{\text{Hb noi}}$$

Pentru a obţine Hb diferite de cele originare este necesar ca cea de a doua moleculă din amestecul iniţial să aibă ambele lanţuri diferite de prima, caz rar întîlnit la hemoglobinele de la aceeaşi specie. De aceea se foloseşte HbS „marcată" prin modificarea lanţului β în amestec cu Hb de analizat (presupus „anormală"). Obţinerea a patru Hb diferite indică modificări în lanţul α, iar obţinerea a două Hb arată modificări în lanţul β (diferit de β^S); pentru stabilirea unui lanţ β diferit de cel normal se foloseşte un test complementar, cu o Hb „marcată" prin modificarea lanţului α.

O altă metodă, mai precisă, este a *amprentelor* (elaborată de Ingram), bazată pe posibilitatea de a separa peptidele rezultate din Hb denaturate prin hidroliză enzimatică (de exemplu cu tripsină), urmată de o cromatografie perpendiculară pe direcţia electroforezei. S-au obţinut astfel 28 de peptide a căror localizare („amprente") oferă un fel de „hărţi" caracteristice fiecărui tip de globină din molecula Hb. Prin compararea „hărţii" unei Hb oarecare cu aceea a Hb normale se poate identifica prezenţa uneia sau a mai multor peptide ce cuprind aminoacizi schimbaţi faţă de cei normali. Izolarea şi analiza secvenţei acestor peptide oferă informaţii precise asupra naturii şi poziţiei aminoacidului (sau aminoacizilor) schimbaţi în lanţ.

Cea mai valoroasă metodă, singura care indică poziţia atomilor în proteine, este *cristalografia cu raze X* care a permis elucidarea structurii tridimensionale a mioglobinei *(John Kendrew)* şi hemoglobinei *(Max Perutz)*, cît şi a altor numeroase proteine *(vezi 1.3.4.3)*.

Scanned with OKEN Scanner

Cele trei componente ale metodei cristalografice cu raze X sînt:

a. Sursa de raze X, de exemplu, cu lungime de undă de 1,54 Å, produse prin accelerarea electronilor contra unei ţinte de cupru *(figura 1.71)*.

b. Cristalul de proteină, de exemplu, adăugarea $(NH_4)_2SO_4$ 3 M la o soluţie concentrată de Mb.

c. Detectorul (de exemplu placă fotografică) care înregistrează devierile (difracţia) razelor X, cu menţiunea că amplitudinea difracţiei produsă de un atom este proporţională cu numărul electronilor săi, de exemplu, atomul de C produce o difracţie de 6 ori mai puternică decît atomul de H.

Cristalul se montează într-un capilar, cu o orientare precisă faţă de fluxul de raze X şi film. În cazul Mb se înregistrează 25.000 de spoturi; se măsoară intensitatea fiecăruia şi se interpretează matematic prin seria Fourier (o sumă de termeni sinus şi cosinus a unghiurilor fiecărui spot faţă de axul razei incidente). Deoarece intensităţile difracţiei cristalelor de Mb nu oferă toate informaţiile necesare calculării seriei Fourier, acestea se completează cu datele oferite de cristale care conţin atomi de metale grele (U sau Pb) legate la unul sau două locuri ale moleculei. Deoarece interpretarea de sinteză finală pentru molecula de Mb conţine aproximativ 1 bilion de termeni este necesară computerizarea datelor cu ajutorul unor calculatoare de performanţă, care, din fericire, s-au dezvoltat în aceeaşi perioadă de timp cu studiile cristalografice ale proteinelor. Iniţial (1957), s-au interpretat numai 400 spoturi ale diagramei de difracţie, corespunzătoare unei rezoluţii de 6 Å care indicau doar aspectul general al situării lanţurilor polipeptidice, deoarece centrele acestora se află la distanţă de 5—10 Å. Pentru precizarea poziţiei grupurilor de atomi, situate la distanţe de 2,8 — 4 Å şi a atomilor individuali, situaţi la 1 — 1,5 Å, s-au interpretat 10.000 de intensităţi ce corespund la o rezoluţie de 2 Å (1959) şi apoi 25.000 de intensităţi, la o rezoluţie de 1,4 Å (1962); în total există 1260 atomi diferiţi de H, cu o precizie de 0,3 Å.

1.3.8.3.2. STRUCTURA PRIMARĂ A GLOBINELOR DIN Mb ŞI Hb

Mioglobina (Mb) este reprezentată printr-un lanţ unic, denumit „*m*", alcătuit, la balenă, din 153 aminoacizi. Secvenţa acestora, ca şi a celor din Mb umană este cunoscută *(Hill, 1965; Edmudson, 1965)* aşa cum rezultă din *tabelele 1.40 şi 1.41*.

Hemoglobina adultului, $HbA = \alpha_2^A\beta_2^A$ este un tetramer alcătuit din 2 lanţuri de globină α cu cîte 141 aminoacizi şi 2 lanţuri β cu cîte 146 aminoacizi, deci are, în total: $(2 \times 141) + (2 \times 146) = 574$ aminoacizi cu secvenţa cunoscută *(G. Braunitzer*, 1961; *Königsberg, 1961) (tabelul 1.41)*. Între lanţurile α^A şi β^A există 64 identităţi şi 16 similitudini de poziţie. Fiecare lanţ globinic leagă cîte un hem.

$HbA_2 = \alpha_2^A\delta_2^A$, însoţeşte, de obicei, în cantităţi mici (1—2%) HbA; lanţul δ_2^A, diferă de β^A prin cîteva poziţii ale aminoacizilor.

Hemoglobina fetală, $HbF = \alpha_2^A\gamma_2^F$ are acelaşi număr total de aminoacizi ca şi HbA (deoarece lanţul γ^F are 146 aminoacizi, la fel cu β^A); diferă de HbA prin poziţia a 37 aminoacizi *(Schroeder, 1963)*. Caracteristic pentru subunitatea γ^F este prezenţa a 3—4 resturi Ile, aminoacid care lipseşte din lanţul β^A *(tabelul 1.41)*.

Privind comparativ secvenţa aminoacizilor din lanţurile α, β, γ şi *m* *(tabelul 1.41)* se constată 22 poziţii comune, cu aminoacizi identici şi 8 poziţii similare; în rest apar regiuni care adesea prezintă secvenţe identice numai între două lanţuri, mai rar între trei lanţuri, dar care diferă între cele patru lanţuri considerate. Astfel, între δ, comparativ cu β şi respectiv γ, diferenţele între aminoacizii componenţi sînt de numai 7%; între γ şi β sau δ de aproximativ 27%; între α şi β, γ sau δ de 50—55%, iar între lanţul *m* (din Mb) şi α, β, γ, respectiv δ, de 76%.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.40

Secvența aminoacizilor din mioglobina de balenă

Simbolurile de sub fiecare aminoacid se referă la poziția lor în regiunile alfa-helix sau din regiunile nonhelicale. /după **A. E. Edmundson, Nature, 205, 833 (1965); H. C. Watson, Progr. Stereochem., 4, 299—333 (1969); L. Stryer, Biochemistry,** ed. W. H. Freeman & comp., San Francisco, pag. 54 (1975).

Val — Leu — Ser — Glu — Gli — Glu — Trp — Gln — Leu — Val — NA1 NA2 A1 A2 A3 A4 A5 A6 A7 A8	10
— Leu — His — Val — Trp — Ala — Lis — Val — Glu — Ala — Asp — A9 A10 A11 A12 A13 A14 A15 A16 AB1 B1	20
— Val — Ala — Gli — His — Gli — Gln — Asp — Ile — Leu — Ile — B2 B3 B4 B5 B6 B7 B8 B9 B10 B11	30
— Arg — Leu — Phe — Lis — Ser — His — Pro — Glu — Thr — Leu — B12 B13 B14 B15 B16 C1 C2 C3 C4 C5	40
— Glu — Lis — Phe — Asp — Arg — Phe — Lis — His — Leu — Lis — C6 C7 CD1 CD2 CD3 CD4 CD5 CD6 CD7 CD8	50
— Thr — Glu — Ala — Glu — Met — Lis — Ala — Ser — Glu — Asp — D1 D2 D3 D4 D5 D6 D7 E1 E2 E3	60
— Leu — Lis — Lis — His — Gli — Val — Thr — Val — Leu — Thr — E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13	70
— Ala — Leu — Gli — Ala — Ile — Leu — Lis — Lis — Lis — Gli — E14 E15 E16 E17 E18 E19 E20 EF1 EF2 EF3	80
— His — His — Glu — Ala — Glu — Leu — Lis — Pro — Leu — Ala — EF4 EF5 EF6 EF7 EF8 F1 F2 F3 F4 F5	90
— Gln — Ser — His — Ala — Thr — Lis — His — Lis — Ile — Pro — F6 F7 F8 F9 FG1 FG2 FG3 FG4 FG5 G1	100
— Ile — Lis — Tir — Leu — Glu — Phe — Ile — Ser — Glu — Ala — G2 G3 G4 G5 G6 G7 G8 G9 G10 G11	110
— Ile — Ile — His — Val — Leu — His — Ser — Arg — His — Pro — G12 G13 G14 G15 G16 G17 G18 G19 GH1 GH2	120
— Gli — Asn — Phe — Gli — Ala — Asp — Ala — Gln — Gli — Ala — GH3 GH4 GH5 GH6 H1 H2 H3 H4 H5 H6	130
— Met — Asn — Lis — Ala — Leu — Glu — Leu — Phe — Arg — Lis — H7 H8 H9 H10 H11 H12 H13 H14 H15 H16	140
— Asp — Ile — Ala — Ala — Lis — Tir — Lis — Glu — Leu — Gli — H17 H18 H19 H20 H21 H22 H23 H24 HC1 HC2	150
— Tir — Gln — Gli HC3 HC4 HC5	153

Gradul de similitudine între aceste lanțuri globinice sugerează ideea că toate au derivat, prin duplicări cromozomice, dintr-o moleculă comună, un „strămoș" al hemoglobinelor actuale, care argumentează teoria evoluției darwiniene (vezi 1.3.8.3.10).

1.3.8.3.2.1. Tipuri de hemoglobine umane

În condiții fiziologice, în sîngele omului se găsesc concomitent mai multe tipuri de hemoglobine: F, A, A_2, A_3, în proporții diferite.

În evoluția ontogenetică *(figura 1.100)*, în săptămînile 10—20 ale vieții intrauterine apar două hemoglobine embrionare, Hb Gower 1 (ε_4), în cantitate mare, și Hb Gower 2 ($\alpha_2^A\varepsilon_2$), în cantitate mică. Acestea sînt progresiv înlocuite cu hemoglobina fetală, HbF ($\alpha^A\gamma_2^F$), astfel încît embrionul cu o talie de 25 cm are 57% HbF, 24% Hb Grower 1, 5% Hb Grower 2 și 1% HbA. Copilul are la naștere 80% HbF, care scade pînă la 0,5—1% (la 2 ani), în paralel cu creșterea proporției de HbA. În viața intrauterină se găsesc și componente

TABELUL 1.41

Secvența lanțurilor α, β și λ din hemoglobina umană și a mioglobinei umane (M) (după **G. Braunitzer**). /Aminoacizii comuni celor 4 lanțuri sînt prezentați cu aldine. Liniile punctate indică cele 8 regiuni dispuse în α-helix/

A

α	Val—	—Leu	—Ser	—Pro	—Ala	—Asp	—Lis	—Thr	—Asn	—Val	—Lis	—Ala	—Ala	—**Tri**	—Gli	—**Lis**	—**Val**	—Gli—
β	Val	—His	—Leu	—Thr	—Pro	—Glu	—Glu	—Lis	—Ser	—Ala	—Val	—Thr	—Ala	—Leu	—**Tri**	—Gli	—**Lis**	—**Val**	—Asn—
γ	Gli	—His	—Phe	—Thr	—Glu	—Glu	—Asp	—Lis	—Ala	—Thr	—Ile	—Thr	—Ser	—Leu	—**Tri**	—Gli	—**Lis**	—**Val**	—Asn—
M	Gli—		—Leu	—Ser	—Glu	—Gli	—Glu	—Tri	—Gln	—Leu	—Val	—Leu	—His	—Val	—**Tri**	—Ala	—**Lis**	—**Val**	—Glu—

10

B C

α	Ala	—His	—Ala	—Gli	—Glu	—Tir	—**Gli**	—Ala	—Glu	—Ala	—**Leu**	—Glu	—**Arg**	—Met	—Phe	—Leu	—Ser	—Phe	—**Pro**	—
β			—Val	—Asp	—Glu	—Val	—**Gli**	—Gli	—Glu	—Ala	—**Leu**	—Glu	—**Arg**	—Leu	—Leu	—Val	—Val	—Tir	—**Pro**	—
γ			—Val	—Glu	—Asn	—Ala	—**Gli**	—Gli	—Glu	—Thr	—**Leu**	—Gli	—**Arg**	—Leu	—Leu	—Val	—Val	—Tir	—**Pro**	—
M	Pro	—Asp	—Val	—Ala	—Gli	—His	—**Gli**	—Asp	—Asp	—Ile	—**Leu**	—Ile	—**Arg**	—Leu	—Phe	—Lis	—Gli	—His	—**Pro**	—

20 30

CD D

α	Thr	—**Thr**	—Lis	—Thr	—Tir	—**Phe**	—Pro	—His	—**Phe**	—	—Asp	—**Leu**	—Ser	—His	—					
β	Tri	—**Thr**	—Gln	—Arg	—Phe	—**Phe**	—Glu	—Ser	—**Phe**	—Gli	—Asp	—**Leu**	—Ser	—Thr	—Pro	—Asp	—Ala	—Val	—Met	—
γ	Tri	—**Thr**	—Gln	—Arg	—Phe	—**Phe**	—Asp	—Ser	—**Phe**	—Gli	—Asn	—**Leu**	—Ser	—Ser	—Ala	—Ser	—Ala	—Ile	—Met	—
M	Glu	—**Thr**	—Leu	—Glu	—Lis	—**Phe**	—Asp	—Lis	—**Phe**	—Lis	—His	—**Leu**	—Lis	—Ser	—Glu	—Asp	—Glu	—Met	—Lis	—

40 50

E

α	Gli	—Ser	—Ala	—Gln	—Val	—**Lis**	—Gli	—**His**	—**Gli**	—Lis	—Lis	—**Val**	—Ala	—Asp	—Ala	—Leu	—Thr	—Asn	—Ala	—
β	Gli	—Asn	—Pro	—Lis	—Val	—**Lis**	—Ala	—**His**	—**Gli**	—Lis	—Lis	—**Val**	—Leu	—Gli	—Ala	—Phe	—Ser	—Asp	—Gli	—
γ	Gli	—Asn	—Pro	—Lis	—Val	—**Lis**	—Ala	—**His**	—**Gli**	—Lis	—Lis	—**Val**	—Leu	—Thr	—Ser	—Leu	—Gli	—Asp	—Ala	—
M	Ala	—Ser	—Glu	—Asp	—Leu	—**Lis**	—Lis	—**His**	—**Gli**	—Val	—Thr	—**Val**	—Leu	—Thr	—Ala	—Leu	—Gli	—Ala	—Ile	—

60 70

EF F

α	Val	—Ala	—His	—Val	—Asp	—Asp	—Met	—Pro	—Asn	—Ala	—Leu	—Ser	—Ala	—**Leu**	—Ser	—Asp	—Leu	—**His**	—Ala	—
β	Leu	—Ala	—His	—Leu	—Asp	—Asn	—Leu	—Lis	—Gli	—Thr	—Phe	—Ala	—Thr	—**Leu**	—Ser	—Glu	—Leu	—**His**	—Cis	—
γ	Ile	—Lis	—His	—Leu	—Asp	—Asp	—Leu	—Lis	—Gli	—Thr	—Phe	—Ala	—Glu	—**Leu**	—Ser	—Glu	—Leu	—**His**	—Cis	—
M	Leu	—Lis	—Lis	—Lis	—Gli	—His	—His	—Glu	—Ile	—Glu	—Leu	—Lis	—Pro	—**Leu**	—Ala	—Gln	—Ser	—**His**	—Ala	—

80 90

(continuare) TABELUL 1.41

	FG · · · G · · ·
α	His—**Lis**—Leu—Arg—Val—Asp—Pro—Val—Asn—Phe—Lis—Leu—Leu—Ser—His—Cis—Leu—Leu—Val—
β	Asp—**Lis**—Leu—His—Val—Asp—Pro—Glu—Asn—Phe—Arg—Leu—Leu—Gli—Asn—Val—Leu—Val—Cis—
γ	Asp—**Lis**—Leu—His—Val—Asp—Pro—Glu—Asn—Phe—Lis—Leu—Leu—Gli—Asn—Val—Leu—Val—Thr—
M	Thr—**Lis**—His—Lis—Ile—Pro—Ile—Lis—Tir—Leu—Glu—Phe—Gln—Ser—Glu—Ala—Ile—Ile—Ser—
	100 · · · 110

	· · · GH · · · H · · ·
α	Thr—**Leu**—Ala—Ala—His—Leu—Pro—**Ala**—Glu—**Phe**—Thr—Pro—Ala—Val—His—Ala—Ser—Leu—Asp—
β	Val—**Leu**—Ala—His—His—Phe—Gli—Lis—Glu—**Phe**—Thr—Pro—Pro—Val—Gln—Ala—Ala—Tir—Gln—
γ	Val—**Leu**—Ala—Ile—His—Phe—Gli—Lis—Glu—**Phe**—Thr—Pro—Glu—Val—Gln—Ala—Ser—Tri—Gln—
M	Val—**Leu**—Asn—Ser—Lis—His—Pro—Gli—Asn—**Phe**—Gli—Ala—Asp—Ala—Gln—Gli—Ala—Met—Asn—
	120 · · · 130

	· · · HC
α	**Lis**—Phe—Leu—**Ala**—Ser—Val—Ser—Thr—Val—Leu—Thr—Ser—Lis—**Tir**—Arg
β	**Lis**—Val—Val—Ala—Gli—Val—**Ala**—Asn—Ala—Leu—Ala—His—Lis—**Tir**—His
γ	**Lis**—Met—Val—Thr—Gli—Val—Ala—Ser—Ala—Leu—Ser—Ser—Arg—**Tir**—His
M	**Lis**—Ala—Leu—Glu—Leu—Phe—Arg—Lis—Asp—Met—Ala—Ser—Asp—**Tir**—Lis—Glu—Leu—Gli—Tir—Gli
	140 · · · 150

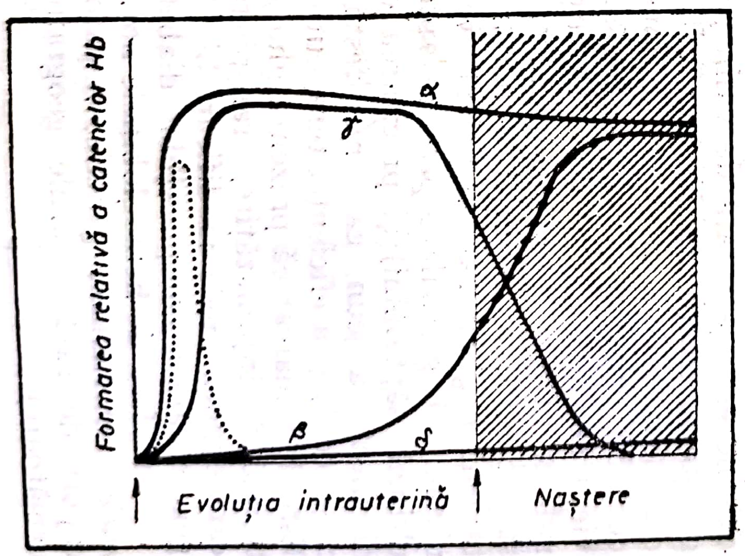


Fig. 1.100. Reprezentarea evoluției catenelor hemoglobinei la om

Scanned with OKEN Scanner

minore, de exemplu, HbF_2 ($\alpha_2^A\gamma^F\gamma^{F-Ac.}$), în care unul din lanţurile γ prezintă grupări acetil şi un tetramer γ_4 (care se întîlneşte şi la adult în talasemie).

Hemoglobinele fetale se deosebesc de ale adultului prin migrarea mai lentă în electroforeză, printr-o rezistenţă relativă în mediu alcalin şi prin afinitatea mai mare faţă de O_2. O caracteristică a hemoglobinelor fetale este raportul Gli/Ala de 3 : 1 faţă de 2 : 3 în viaţa extrauterină (după *Al. Vîlcu, 1977*).

La adult, predomină HbA denumită şi HbA_1 (97—99%), însoţită de cantităţi mici de HbF (1%), HbA_2 ($\alpha_2\delta_2$) şi HbA_3; ultima ar reprezenta o formă de „îmbătrînire" a HbA, de care diferă prin oxidarea unor grupări —SH din cisteină.

Deoarece biosinteza fiecărui lanţ polipeptidic (globină) este controlată de către o genă (unitate ereditară), omul posedă cîte o pereche de gene pentru fiecare din lanţurile menţionate; încă în viaţa intrauterină şi în continuare, după naştere, genele care controlează biosinteza lanţurilor ε şi γ^F sînt represate, în paralel cu activarea celor pentru lanţurile β^A, care determină prezenţa simultană a hemoglobinelor embrionare şi fetale cu cele ale adultului, denumită „eterogenitate de maturare" *(figura 1.100)*.

Determinările cromatografice (macrocoloane de uz curent) separă Hb globală a adultului în următoarele fracţiuni: Hb principală A_0 (92%), precedată de HbA_1 alcătuită din patru fracţiuni: $A_{1\alpha}$ (0,2%), $A_{1\alpha 2}$ (0,2%), A_{1b} (0,5%) şi A_{1c} (3—5%); urmează Hb F (sub 1%) şi A_2 (2—5%).

HEMOGLOBINA GLICOSILATA, caracterizată prin prezenţa unei molecule de glucoză legată de valina, care încheie lanţul beta al hemoglobinelor se găseşte în fracţiunea HbA_{1c}. Iniţial a fost considerată ca un *marcaj genetic* al diabeticilor, dar, ulterior s-a dovedit că se produce după biosinteza moleculei de HbA printr-o glicosilare nonenzimatică ireversibilă care are loc tot timpul vieţii hematiilor (120 zile). Deoarece intensitatea acestui proces este proporţională cu nivelul crescut al glucozei din sînge, la diabeticii compensaţi cantitatea sa depăşeşte de 2—3 ori normalul (în medie 5,8%) iar la cei cu regim sau tratament neglijat sau ineficient, valorile sînt şi mai mari (9,8%). În practică, nivelul Hb glicozilate permite aprecierea echilibrului glicemic retrospectiv (din ultimele săptămîni) şi precizarea diagnosticului (de ex. la unii normoglicemici dimineaţa à jeun, care manifestă curbă de tip diabetic la proba de încărcare cu glucoză) şi a eficienţei terapeutice respectiv a regimului instituit diabeticului. Este de remarcat că prezenţa glucozei alterează caracteristicile Hb: solubilitate, timpul de înjumătăţire, transportul de oxigen (curba de disociere turtită) şi care explică unele modificări biochimice şi clinice determinate de hiperglicemia generatoare a complicaţiilor diabetice.

În afară de hemoglobinele normale se cunosc o serie de hemoglobine *„anormale"* determinate genetic, nepatologice sau patologice, care variază mult în raport de rasă şi ariile geografice (a se vedea cap. 1.3.8.3.10.1 şi volumele următoare).

1.3.8.3.3. STRUCTURA TRIDIMENSIONALĂ A MIOGLOBINEI (Mb)

Studiile cristalografice cu raze X *(vezi 1.3.8.3.1)* au permis elaborarea unui model al mioglobinei *(J. C. Kendrew)* care relevă că lanţul polipeptidic este pliat într-o formă de ghem compact *(figura 1.101)* cu dimensiunile de 45/35/25 Å, cu puţine spaţii libere în interior.

Scanned with OKEN Scanner

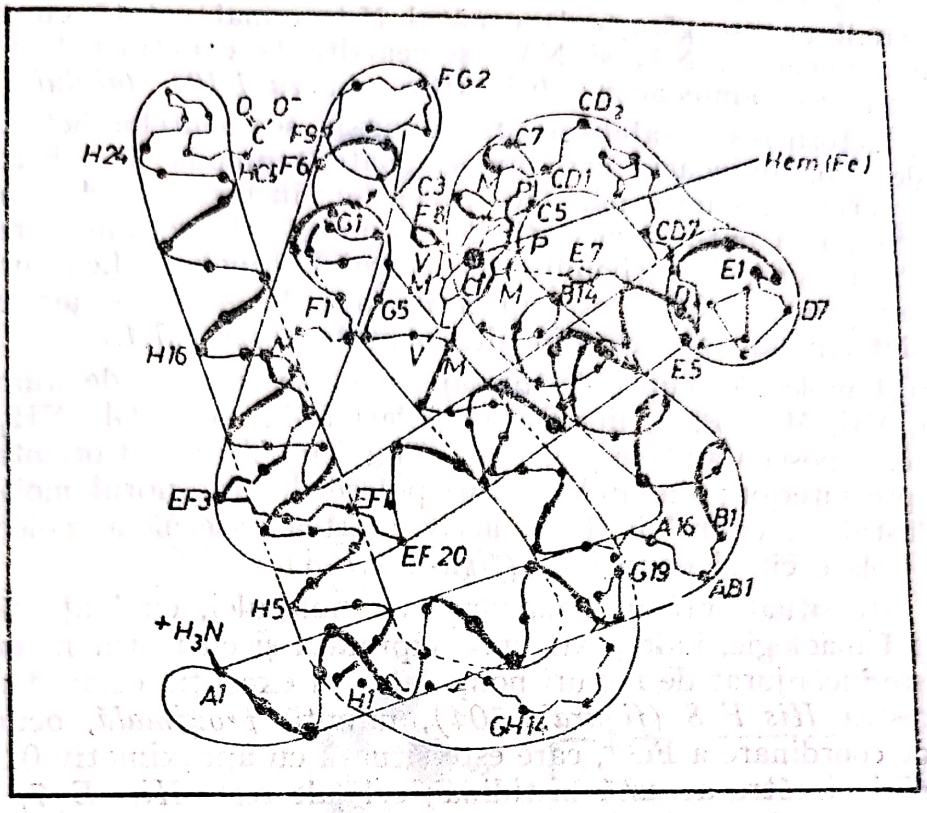


Fig. 1.101. Model pentru structura mioglobinei (după Kendrew)

În cadrul moleculei există 8 segmente (zone) majore dispuse în α-helix spre dreapta (75% din moleculă) *(figura 1.102)*, notate cu literele $A - H$ (în lanțul A, primul rest de aminoacid se notează cu A_1, al doilea cu A_2 etc.; la fel și pentru celelalte segmente) și 7 zone nonhelicale; 5 dintre acestea separă segmentele helicale și se notează cu literele zonelor helicale între care se găsesc

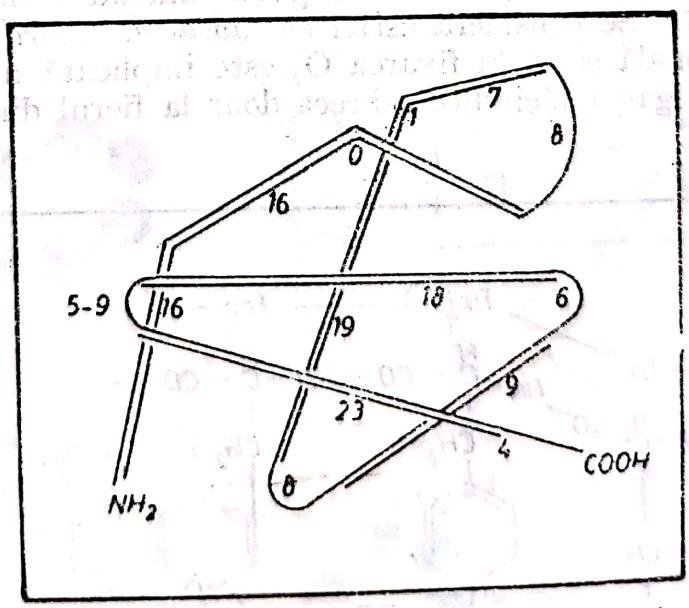


Fig. 1.102. *Reprezentarea schematică a mioglobinei.* **Liniile duble indică segmentele cu structură α-helix, iar cifrele arată numărul resturilor de aminoacizi din fiecare segment.**

(AB, CD etc.), una se găseşte la capătul N-terminal notată cu NA (cu două resturi de aminoacizi: NA_1 şi NA_2) şi cealaltă la capătul C-terminal (notată HC, cu 5 resturi de aminoacizi: HC1—HC5 *(figura 1.101 ; tabelul 1.40 şi 1.41)*.

Dintre factorii responsabili de „terminarea" segmentelor helicale se citează 4 resturi de Pro, aminoacid care nu se poate acomoda în α-helix (al cincilea rest de Pro, situat într-un capăt, face excepţie) ; în restul de 4 terminaţii intervin alţi factori, mai puţin cunoscuţi, de exemplu, interacţiunea grupelor —OH ale Ser şi Tre cu grupele carbonilice ale lanţului principal. Legăturile peptidice sînt planare ; grupa —CO— este în trans faţă de —NH— iar unghiurile şi distanţele sînt similare cu cele din alte peptide *(vezi 1.3.4.1)*.

Interiorul moleculei cuprinde aproape exclusiv resturi de aminoacizi nonpolari (Leu, Val, Met, Phe), lipsind cei polari (Glu, Asp, Glu-NH_2, Lis, Arg) ; aminoacizii care posedă ambele polarităţi (Tre, Tir, Trp) sînt orientaţi cu partea nonpolară spre interior ; singurele resturi polare din interiorul moleculei de Mb sînt două histidine, cu rol în locul activ. Partea externă a moleculei conţine atît resturi polare cît şi nonpolare *(figura 1.103)*.

Hemul este situat într-un „buzunar" al moleculei, cu lanţurile propionat, ionizate la pH fiziologic, îndreptate spre suprafaţă şi cu restul hemului în interior, unde este înconjurat de resturi nonpolare, cu excepţia celor două histidine. Una din acestea *His F 8 (figura 1.104)*, numită *proximală*, ocupă cea de a 5-a poziţie de coordinare a Fe^{2+}, care este situată cu aproximativ 0,3 Å în afara planului porfirinei către această histidină ; celalalt rest *His E 7*, numit histidină *distală* nu este legat de hem. Cea de a 6-a poziţie de coordinare a fierului, situată de partea opusă a planului porfirinei, reprezintă *locul de legare al oxigenului* ; ea apare „liberă" în Mb (deoximioglobină) şi leagă O_2 în oxi-ferromioglobină (MbO_2) sau apa în ferri-Mb *(tabelul 1.42)*. Deci oxigenarea Mb implică inserţia O_2 (respectiv a apei) la a 6-a poziţie de coordinare a fierului din hem.

Resturile în contact cu hemul provin din diferite segmente ale secvenţei de aminoacizi din regiunea C 4 la H 14 (corespunzînd aminoacizilor 39 şi 138 din secvenţa liniară). Se consideră astfel că *„locul de legare al hemului"* este o entitate tridimensională şi că în fixarea O_2 este implicată numai o parte mică din molecula Mb, legarea făcîndu-se direct doar la fierul din hem.

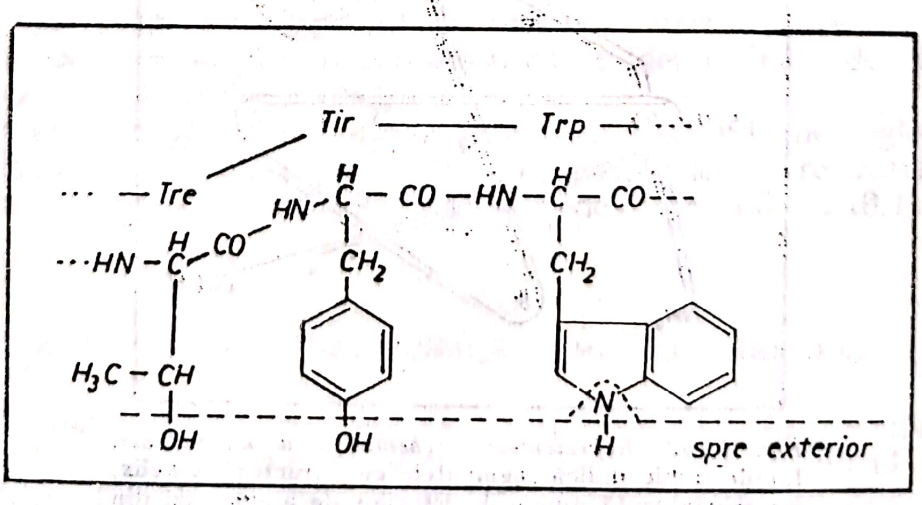


Fig. 1.103. Orientarea resturilor aminoacizilor cu grupări polare şi nonpolare

Scanned with OKEN Scanner

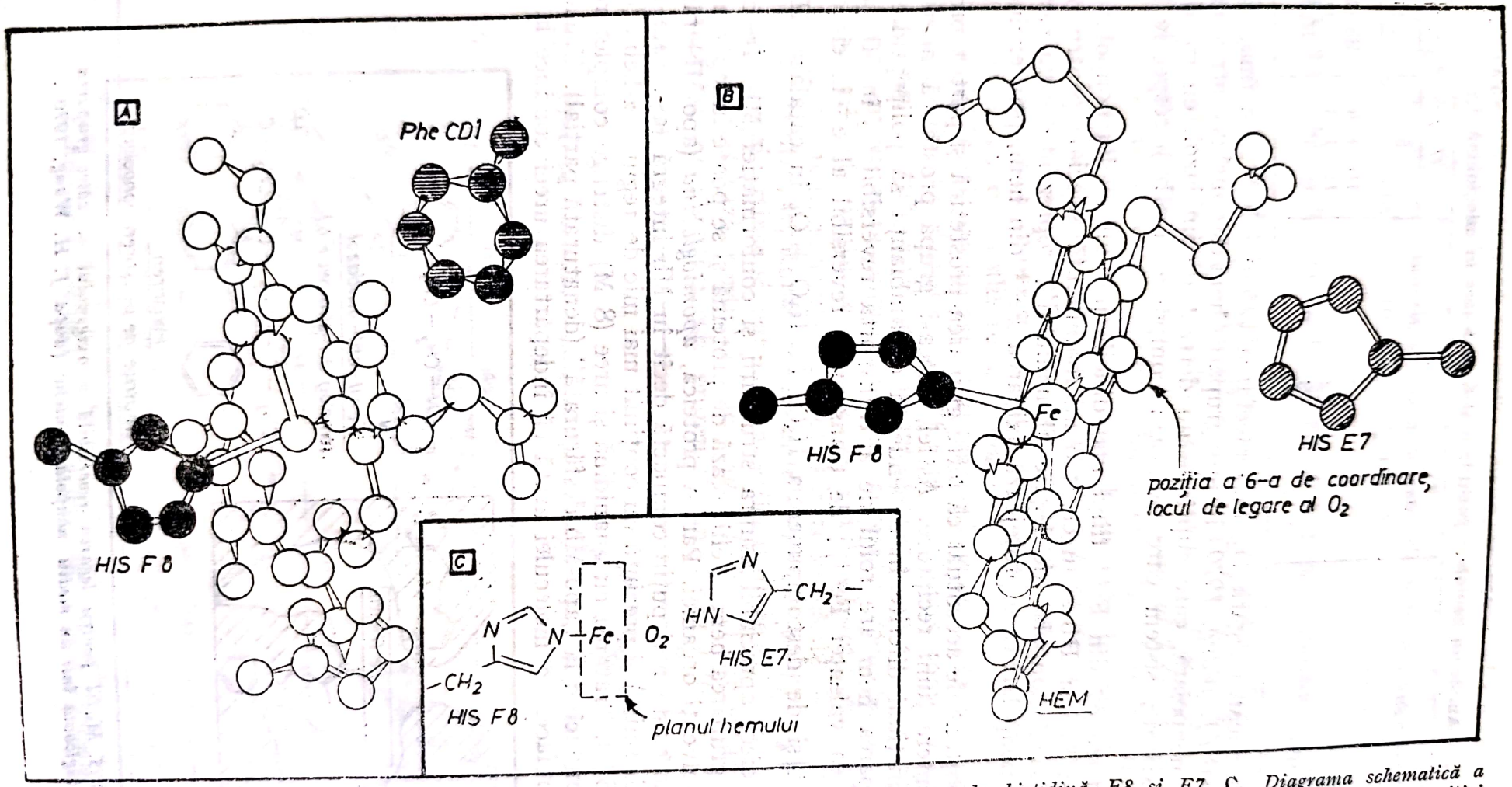


Fig. 1.104. *A și B: Modele pentru ilustrarea poziției fenilalaninei CD1 și a resturilor de histidină F8 și E7.* C. *Diagrama schematică a* ***locurilor legăturilor în mioglobină.*** His F8 (proximală) ocupă cea de a 5-a poziție de coordinare; His E7 (distală) este situată în apropierea poziției a 6-a de coordinare, care leagă oxigenul *(după L. Stryer, 1975).*

TABELUL 1.42

Ambianța hemului: pozițiile 5 și 6 de legare în mioglobină

Forma mioglobinei	*Stare de oxidare a fierului*	*Ocupantul poziției*	
		5	6
Mb (= Deoxi-Mb)	+2	His F 8	liberă
MbO_2 (Oxi-Mb)	+2	His F 8	O_2
Ferri-Mb (Met-Mb)	+3	His F 8	H_2O

Pentru explicarea legării O_2, fără afectarea valenței Fe^{2+}, s-a imaginat un model artificial *(J. Wang, 1970)* în care gruparea hem este inclusă într-o matrice de polistiren nonpolară, care cuprinde un derivat de imidazol, cu rol similar His F 8 proximale, sistem care mimează comportarea Mb și respectiv MbO_2 *(figura 1.105)*

Desprinderea e^- din Fe^{2+} fiind mai dificilă într-un mediu nonpolar decît în unul apos, Mb și Hb și-au creat o microambianță specială pentru partea prostetică, „Locul nonpolar de legare al hemului", reprezentat prin resturile aminoacizilor nonpolari care protejează oxidarea Fe^{2+} din hem, prin excluderea apei.

Este important de accentuat că între gruparea prostetică și partea proteică se stabilesc interacțiuni reciproce. Astfel, aceeași grupă prostetică manifestă, în general, funcțiuni diferite în dependență de ambianța sa polipeptidică, de exemplu, gruparea hem are rolul de a transporta reversibil O_2 în Mb și Hb (fără schimbarea valenței Fe^{2+}); de transportor reversibil al e^- în citocromi $\left(Fe^{2+} \underset{+e^-}{\overset{-e}{\rightleftharpoons}} Fe^{3+}\right)$ și de descompunere a H_2O_2 în $H_2O + O_2$ în catalază. Hemul manifestă un efect apreciabil asupra structurii și conformației Mb. În mediu acid (pH 3,5), gruparea hem se eliberează de proteină și se poate îndepărta prin extragere cu solvenți organici. Partea proteică, *apomioglobina* (apo-Mb) rămasă în soluția apoasă este mai puțin compactă decît în Mb integră (așa cum arată studiile hidrodinamice) și prezintă un conținut mai mic de regiuni α-helix (60%) față de Mb (75%). Tratarea cu guanidină și uree (8 M) distruge complet regiunile α-helix, conducînd la „apo-Mb desfășurată" (denaturată parțial). Urmărirea procesului de refacere a moleculei arată că îndepărtarea ureei conduce la apo-

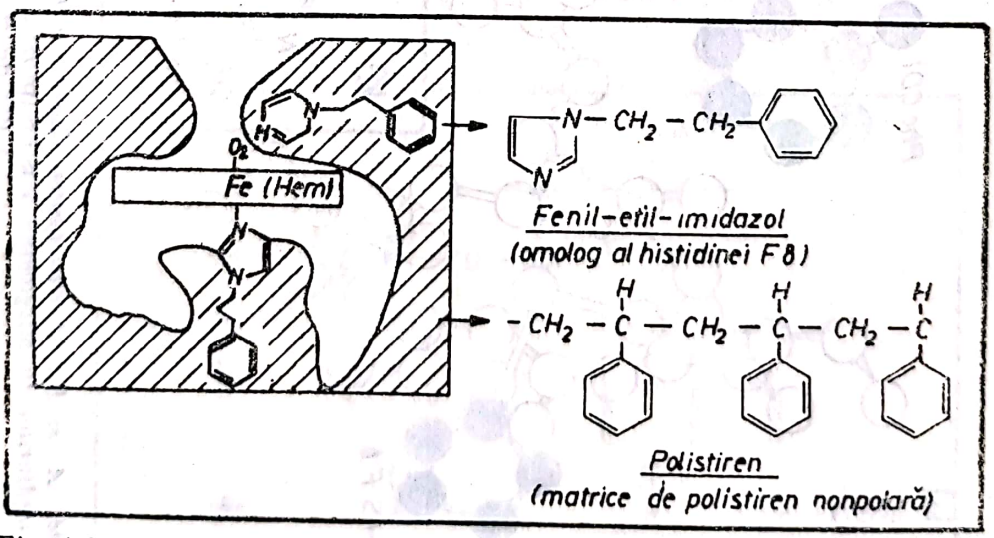


Fig. 1.105. Model pentru legarea reversibilă a oxigenului de către gruparea hem, înglobată într-un mediu nonpolar sintetic (după J. H. Wang, 1970).

mioglobina parţial înfăşurată (cu 60% α-helix, identică celei de mai sus); adăugarea, în continuare, a hemului reface complet molecula Mb identică celei originare, sugerînd că structura tridimensională a Mb este inerentă secvenţei aminoacizilor din apomioglobină; de asemenea, este de semnalat similitudinea dintre structura Mb în soluţie şi în stare cristalizată.

1.3.8.3.4. STRUCTURA TRIDIMENSIONALĂ A HEMOGLOBINEI (Hb)

Prin analize de difracţie cu raze X, la mare putere de rezoluţie, s-a arătat că structura lanţurilor α şi β din Hb umană este foarte asemănătoare cu a lanţurilor *m* (din Mb), existînd aceleaşi zone helicale şi nonhelicale, cu excepţia zonei HC, care lipseşte din Hb *(M. Perutz) (tabelul 1.41)*. Compararea structurii spaţiale cu secvenţa aminoacizilor relevă, la fel ca în cazul lanţului *m*, că numărul şi dispunerea zonelor nonhelicale este în strînsă dependenţă de conţinutul în prolină, aminoacid care nu dă legături de H. Se remarcă, de asemenea, dispunerea lanţurilor nonpolare (hidrofobe) ale aminoacizilor spre interiorul moleculei şi a celor polare (hidrofile) spre mediul extern (apă), ceea ce conferă moleculei o stabilitate mai mare.

Molecula de Hb are un aspect aproape sferic cu un Ø de aproximativ 55 Å (64/55/52 Å), în care lanţurile α şi β sînt asamblate compact în cadrul tetramerului prin legături covalente; în interior apare o cavitate liberă de 25/5—10 Å, suficient de mare pentru a permite accesul moleculelor de apă.

Legăturile între lanţurile identice (α—α şi β—β) sînt puţine, de natură polară şi situate într-o regiune scurtă, în special între grupările $-COO^-$ şi $-NH_3^+$ terminale. Din contră, legăturile între lanţurile diferite (α—β) se găsesc de-a lungul unei regiuni mai extinse şi sînt nonionice (legături de H, forţe Van der Waals), aşa cum se ilustrează pentru Hb în *figura 1.106*. O prezentare mai completă a contactelor între lanţuri este prezentată în *figura 1.107*.

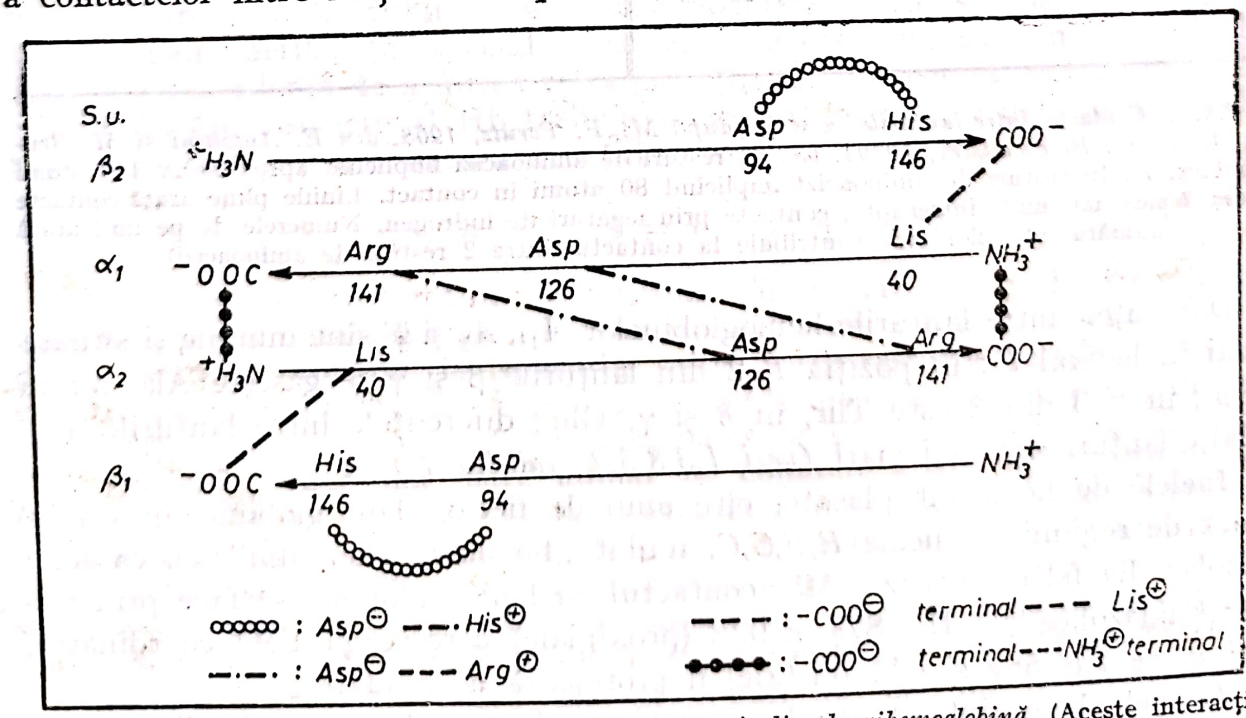


Fig. 1.106. Legături încrucişate între subunităţile (S.u.) din deoxihemoglobină. (Aceste interacţiuni, **noncovalente, electrostatice se rup prin oxigenarea la oxihemoglobină).**

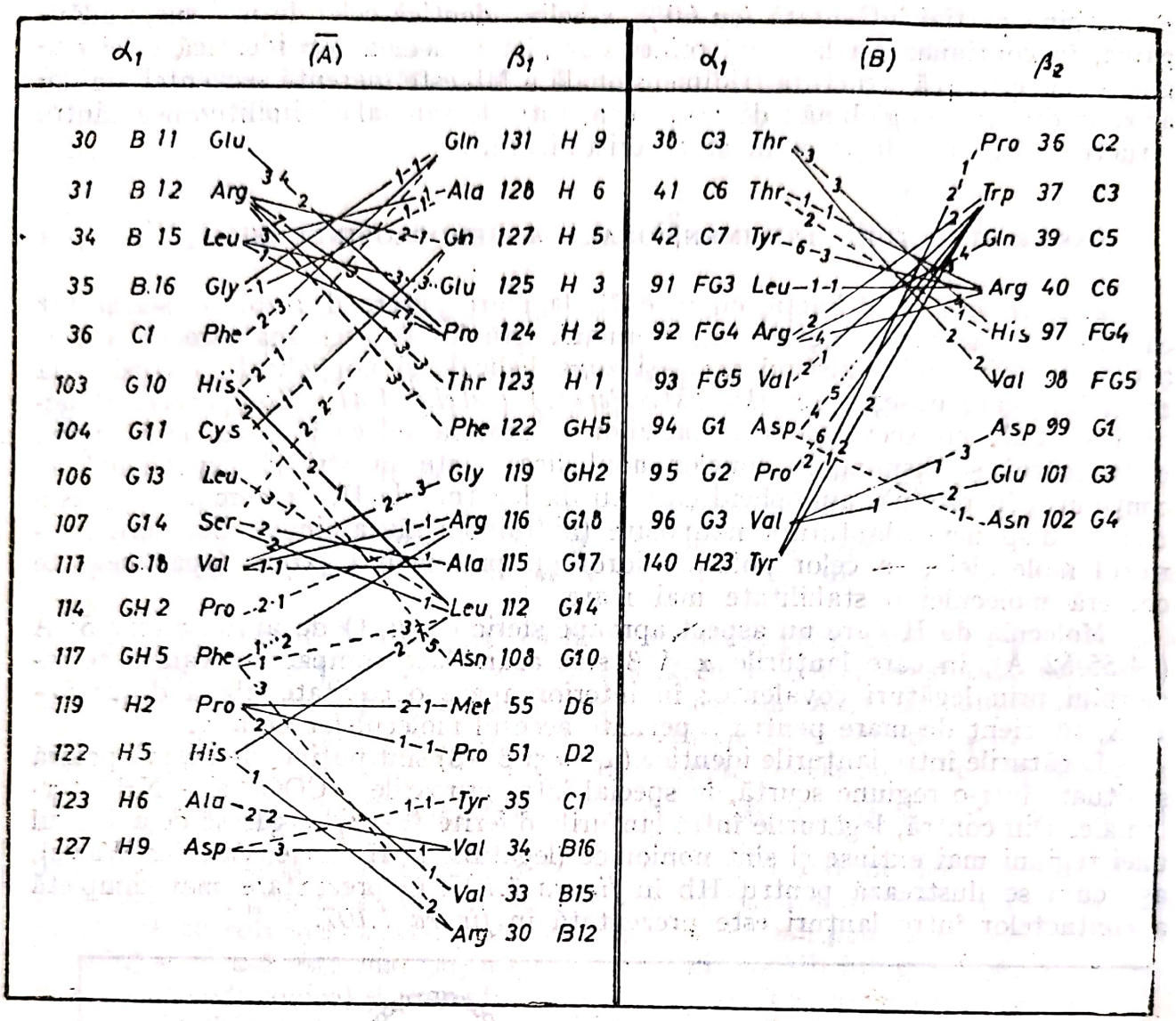


Fig. 1.107. Contacte între lanțurile α și β (după M. F. Perutz, 1968, din E. Antonini și M. Brunoni, Ann. Rev. Biochemistry, 1970). (*A.* 34 resturi de aminoacizi implicînd aproximativ 110 atomi în contact. *B.* 19 resturi de aminoacizi implicînd 80 atomi în contact. Liniile pline arată contacte van der Waals, iar liniile întrerupte, contacte prin legături de hidrogen. Numerele de pe linii arată numărul atomilor care contribuie la contactul între 2 resturi de aminoacizi).

Diferențele între lanțurile hemoglobinelor A_1, A_2 și F sînt minime și situate numai în helixul F: în poziția F 2 din lanțurile β și γ se găsește Ala, iar în δ, Ser; în F 3 din β este Thr, în δ și γ, Gln; diferențele între lanțurile α și celelalte lanțuri sînt mai mari *(vezi 1.3.8.3.2; tabelul 1.41)*.

Inelele de hem sînt plasate, cîte unul de fiecare lanț globinic, în spațiul format de regiunile helicale *E,F,G,C*, numit „buzunarul hemului", cu caracter nonpolar. La fel ca în cazul Mb, contactul cu lanțul globinic se face prin resturile imidazolice ale His 87α și 92β (proximale) care leagă Fe^{2+} coordinativ, în timp ce His 58α și 63β (distale) îl protejează de oxidare.

Grupele hem sînt situate la periferia moleculei de HbO_2, la distanță de 36 Å între 2 lanțuri α, de 25,2 Å între lanțurile α și β și de 33,4 Å între două

lanţuri β. Situarea la distanţe atît de mari sugerează mecanismul alosteric în efectul lor cooperativ *(vezi 1.3.8.3.5; 1.3.8.3.6)*.

Un rol important revine în structura şi funcţiile Hb aminoacizilor aromatici: Tir HC 2, situată între helixurile H şi F, pe care le leagă prin legături de H; Trp din 14α şi 15β, situaţi paralel cu hemul, la o distanţă de 14 Å intervin în interacţiuni energetice; iradierea HbCO cu raze U.V. cu lungime de undă egală cu a absorbţiei maxime a Trp duce la desfacerea instantanee a CO de pe Hb—Fe^{2+}—CO.

1.3.8.3.4.1. Procese de asociere-disociere ale Hb

Hemoglobinele pot suferi disocieri reversibile în subunităţi care păstrează capacitatea de legare a diferiţilor liganzi.

Metoda ultracentrifugării arată disocierea HbO_2 tetramer pînă la dimeri şi, în măsură mică, pînă la monomeri; gelfiltrarea a permis determinarea constantelor de echilibru între tetrameri ⇌ dimeri şi mai puţin pentru dimeri ⇌ monomeri (din cauza cantităţilor mici a ultimilor). Date utile s-au obţinut prin urmărirea sedimentării în soluţii saline (NaCl 2 M), în tampon acetat, în soluţii alcaline (pH 9); prin tratarea cu p-mercuribenzoat, iniţial reacţionează 2 grupe —SH titrabile ale Cis 93β cu formare de dimeri şi, în continuare, grupele —SH mascate ale Cis 104α şi 112β, cu producerea monomerilor.

Studiile schimburilor de entropie, cu măsurarea calorimetrică a căldurii ce însoţeşte reasocierea lanţurilor, sugerează că Hb legate cu liganzi manifestă o stare de preechilibru între tetramer ($\alpha_2\beta_2$) şi doi dimeri ($\alpha\beta$) funcţional eterogeni: unul cu proprietăţi similare tetramerului (dimer cooperativ) şi unul cu proprietăţi similare monomerului (dimer noncooperativ). Procesul se complică prin apariţia monomerilor (în special în condiţii de disociere extremă) şi prin tendinţa monomerilor β de a forma tetrameri (β_4). În consecinţă, pentru aprecierea echilibrului de disociere al Hb trebuie să se ţină seama de o serie de posibilităţi, care influenţează natura reacţiilor parţiale:

$$\alpha_2\beta_2 \rightleftharpoons 2\alpha\beta\,;\quad \alpha\beta \rightleftharpoons \alpha + \beta\,;\quad 4\beta \rightleftharpoons \beta_4$$

În disocierea Hb tetramer se formează în special dimeri simetrici ($\alpha\beta$), în concordanţă cu numărul legăturilor de contact între lanţurile similare ($\alpha—\alpha$ şi $\beta—\beta$) limitate, probabil, la legăturile saline între resturile terminale, în timp ce între lanţurile diferite ($\alpha—\beta$) există un număr mai mare de legături, în majoritate prin resturile nonpolare ale aminoacizilor şi prin legături de H *(figura 1.106 şi 1.107)*. Cel mai mare număr de contacte apare între lanţurile α_1 şi β_1 şi anume 34 resturi cu 110 atomi, aparţinînd în special lanţurilor laterale ale aminoacizilor situaţi în helixul *B*, *G* şi *H*. Suprafaţa $\alpha_1\,\beta_2$ din helixurile *C*, *F* şi *G*, stabilizată prin 19 resturi ce interacţionează, deşi are un număr mai mic de contacte, reprezintă calea cea mai scurtă între 2 hemi ai moleculei şi sugerează ideea că este de importanţă primară în interacţiunile dintre grupele hem.

Studiile asupra Hb reduse (Hb, deoxi-Hb) sînt mai dificile deoarece necesită condiţii anaerobe şi utilizarea unor reactivi pentru îndepărtarea oxigenului (de exemplu, ditionit), care amplifică interferenţa reacţiilor secundare. Se admite

că echilibrul de asociere-disociere a Hb diferă de al hemoglobinelor legate cu liganzi; prima are o tendinţă mai mică de disociere în subunităţi decît HbO_2 sau Hb legate cu alţi liganzi *(Mc. Lachlan, H. Muirehead, M. F. Perutz, 1969)*.

1.3.8.3.5. RELAŢII STRUCTURĂ-FUNCŢIE. ECHILIBRUL CU DIFERIŢI LIGANZI

Comportarea Hb faţă de O_2 şi alţi liganzi depinde de caracteristicile structurale care determină efectele alosterice.

Lanţurile izolate α au proprietăţi foarte asemănătoare cu ale lanţului *m* (din Mb), cu o mare afinitate faţă de O_2 (curbă tip hiperbolă); lanţurile β izolate au o afinitate mai mică şi manifestă tendinţa de a forma tetrameri (β_4). Toate acestea sînt complet lipsite de efectele alosterice.

Trecerea de la monomeri la tetramerii cu subunităţi diferite conferă hemoglobinei caracteristici funcţionale noi: capacitatea de transport a H^+ şi CO_2; efectul cooperativ în fixarea O_2 (curbă sigmoidă de disociere a HbO_2) cu o afinitate globală mai mică pentru oxigen; dependenţa curbei de disociere a HbO_2 de pH, CO_2 şi fosfaţii organici (de exemplu, difosfoglicerat). Toate aceste caracteristici, cu rol determinant în procesele de reglare biochimico-fiziologică, lipsesc în cazul monomerilor (lanţurile α, β, γ, *m* etc.) şi al tetramerilor cu subunităţi identice. Se poate astfel deduce că proprietăţile alosterice rezultă din interacţiunile dintre cele două tipuri de subunităţi diferite (α şi β) care alcătuiesc Hb tetramer.

Cele mai numeroase studii ale echilibrului cu liganzii s-au efectuat cu privire la legarea oxigenului, atît datorită semnificaţiei biologice a echilibrului $Hb + O_2 \rightleftharpoons HbO_2$, cît şi uşurinţei cu care se poate urmări curba de disociere a HbO_2, singurul factor de eroare fiind posibilitatea autooxidării Fe^{2+}. Acest echilibru se exprimă în termenii generali ai ecuaţiei şi curbei lui Hill *(vezi 1.3.8.3.6)*, în care *n* este indicatorul numărului locurilor de interacţiune permiţînd corelarea cu energia liberă a procesului *(J. Wyman, 1964, 1969)*.

În privinţa *efectului celui de al treilea ligand* este de accentuat că echilibrul Hb cu liganzii este dominat de interacţiunile heterotropice dintre hemi şi locurile de legare ale proteinei. Aceste interacţiuni stau la baza influenţei componenţilor unor solvenţi asupra echilibrului Fe^{3+} din Hb cu liganzii şi sînt de o deosebită importanţă deoarece constituie unul din mecanismele moleculare majore de control şi reglare a schimburilor gazoase, respectiv a „respiraţiei".

1.3.8.3.6. OXIHEMOGLOBINA (HbO_2). COEFICIENTUL LUI HILL

Principala proprietate biochimico-fiziologică a Hb este *capacitatea de a fixa reversibil O_2, prin legarea coordinativă, fără modificarea valenţei Fe^{2+}*.

Comparînd formarea HbO_2 (în %), în funcţie de presiunea parţială a oxigenului (pO_2) se obţine o curbă, exprimată în forma sa „clasică" de către Barcroft.

Curbele de asociere, cît şi *curbele de disociere*, care se preferă în prezent, au aspecte diferite, în dependenţă de numărul şi natura lanţurilor „hem-globină". Mb, lanţurile izolate ale Hb (α, β, γ) şi tetramerii alcătuiţi din subunităţi identice (de ex. β_4) oferă curbe asemănătoare, de tip hiperbolă (caracteristice lipsei efectelor cooperative), în timp ce hemoglobinele tetramere, alcătuite din 2 lanţuri

diferite (de exemplu $\alpha_2\beta_2$; $\alpha_2\gamma_2$ etc.), manifestă un alt tip al curbei, *sigmoidă*, care indică interacţiuni alosterice cooperative între subunităţile tetramerului.

Se numesc *efecte alosterice*, interacţiunile la distanţă între locurile stereospecifice distincte ale unor molecule. Asemenea efecte se manifestă, practic, prin modificarea de către diferiţi liganzi a echilibrului între două forme ale aceleiaşi proteine şi care diferă între ele prin anumite proprietăţi, de exemplu prin afinitatea lor pentru un anumit ligand; un ligand este „alosteric" dacă prezintă efecte cooperative (*Monod, Wyman, Changeaux, 1965*).

În cazul particular al *hemoglobinei*, fixarea O_2 manifestă un efect cooperativ, fiind cunoscut că proprietăţile Hb diferă de ale HbO_2. Astfel, cristalele Hb de cal apar sub formă de plăci hexagonale, iar cele de HbO_2 sînt aciculare (*Hauro-witz, 1837*); spectrele de absorbţie în regiunea vizibilă diferă între Hb şi HbO_2 (*figura 108.*), ceea ce face ca culoarea sîngelui venos să fie mai închisă şi cu nuanţe de violet-albastru faţă de a celui arterial, care are o culoare roşie-vie (datorită HbO_2). CO poate înlocui O_2 din HbO_2 cu conservarea efectului cooperativ; observaţia că după disocierea complexului HbCO cu raze U.V., viteza iniţială de recombinare este foarte mare (revenirea la „normal" în aproximativ 1/1000 sec) pledează pentru o conformaţie diferită a complexului HbCO în raport cu Hb liberă şi sugerează că această conformaţie persistă un timp foarte scurt după disociere (*Gibson, 1959*).

Aprecierea efectului cooperativ se poate urmări cu ajutorul *ecuaţiei*, respectiv a *coeficientului lui Hill*.

Prin Y se defineşte gradul de saturare, adică de ocupare a locurilor de legare ale O_2; valorile sale se situează între 0 (toate locurile libere) şi 1 (toate locurile ocupate). Reprezentarea lui Y faţă de pO_2 (presiunea parţială a oxigenului)

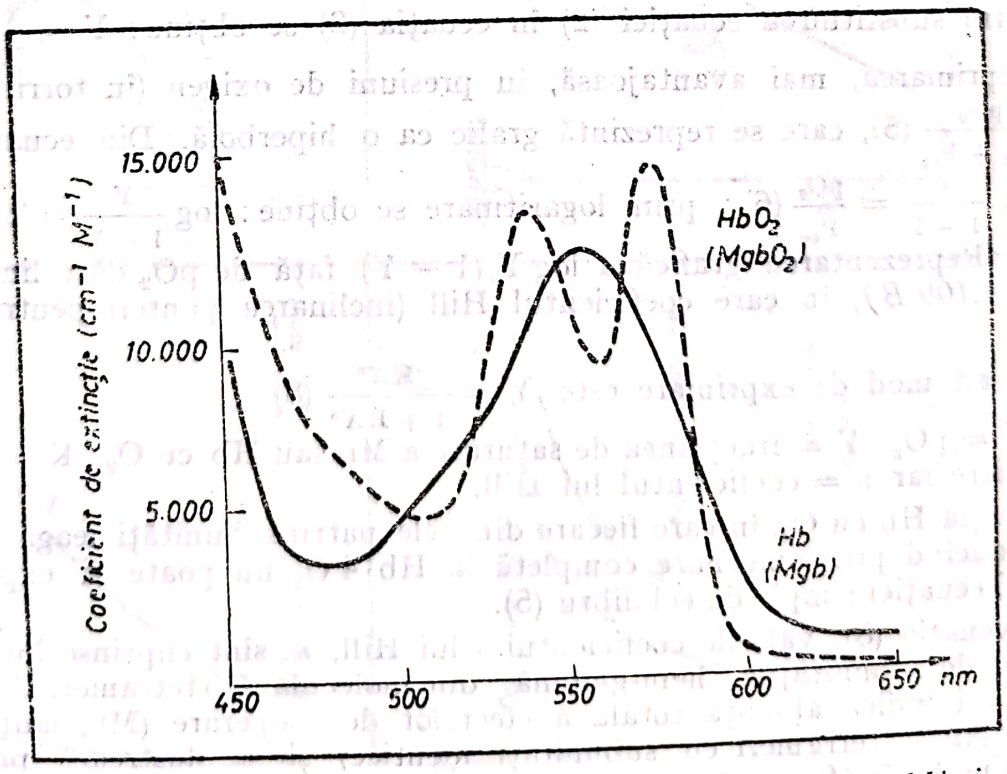


Fig. 1.108. Spectrele de absorbţie în vizibil ale hemoglobinei şi mioglobinei reduse (Hb, Mgb) şi oxidate (HbO_2, $MgbO_2$).

oferă *„curba de disociere a oxigenului"*, care prezintă următoarele diferențe între Mb (lipsită de efecte cooperative) și Hb (cu efecte cooperative) *(figura 1.109 A)*:

a. Înălțimea curbelor Y pentru anumite puncte arată că Mb are o afinitate mai mare pentru O_2 decît Hb. Afinitatea O_2 poate fi apreciată prin P_{50} = presiunea parțială a O_2 la care 50% din locurile pentru oxigen sînt ocupate de acesta ($Y = 0{,}5$), cu valoarea de 1 torr pentru Mb și 26 torri pentru Hb (*1 torr*, după numele lui Evangelista Torricelli (1608—1647), inventatorul barometrului cu mercur, reprezintă presiunea unei coloane de Hg înaltă de 1 mm la 0°C, în condiții standard de gravitate).

b. Curba MbO_2 are un aspect de hiperbolă iar cea a HbO_2 este sigmoidă; în termeni moleculari aceasta relevă că legarea O_2 la Hb este cooperativă (legarea O_2 la un hem ușurează legarea, în continuare la ceilalți). Presupunînd cazul coexistenței unor specii de molecule de Hb tetramer diferite, unele care au fixate 3 mol de O_2 și altele 1 mol O_2, prin oxigenarea în continuare va reacționa primul tip de molecule care se vor satura cu 4 mol O_2 (deoarece fixarea O_2 la primele locuri, ușurează fixarea celor următoare). În cazul cedării oxigenului, se va detașa întîi molecula de O_2 de pe Hb cu o singură moleculă legată, molecula de Hb cu patru O_2 rămînînd neafectată. Acest mod de oxigenare și eliberare a O_2 este de mare importanță fiziologică asigurînd transportul în sînge și aprovizionarea țesuturilor cu oxigen în condiții optime.

Legarea O_2 la Mb și respectiv disocierea MbO_2 corespunde unei reacții simple de echilibru: $MbO_2 \rightleftharpoons Mb + O_2$ (1). Constanta de echilibru a disocierii MbO_2 este $K = \frac{[Mb][O_2]}{[MbO_2]}$ (2), în care concentrațiile Mb, MbO_2 și O_2 (necombinat) sînt exprimate în moli/litru. $Y = \frac{[MbO_2]}{[MbO_2] + [Mb]}$ (3) definește „saturarea parțială". Prin substituirea ecuației (2) în ecuația (3) se obține: $Y = \frac{[O_2]}{[O_2] + K}$ (4). Prin exprimarea, mai avantajoasă, în presiuni de oxigen (în torri) se obține $Y = \frac{pO_2}{pO_2 + P_{50}}$ (5), care se reprezintă grafic ca o hiperbolă. Din ecuația (5) rezultă că $\frac{Y}{1-Y} = \frac{pO_2}{P_{50}}$ (6); prin logaritmare se obține: $\log \frac{Y}{1-Y} = \log pO_2 - \log P_{50}$ (7). Reprezentarea grafică a $\log Y/(1-Y)$ față de pO_2 dă o linie dreaptă *(figura 1.109 B)*, în care coeficientul Hill (inclinarea pantei) pentru Mb este $n = 1$.

Un alt mod de exprimare este $Y = \frac{KX^n}{1 + KX^n}$ (8)

unde $X = pO_2$; Y = fracțiunea de saturare a Mb sau Hb cu O_2, K = constanta de asociere iar n = coeficientul lui Hill.

Reacția Hb cu O_2, în care fiecare din cele patru subunități leagă individual O_2, conducînd prin oxigenare completă la $Hb \cdot 4\,O_2$ nu poate fi exprimată în termenii ecuației simple de echilibru (5).

În ecuația (8), valorile coeficientului lui Hill, n, sînt cuprinse între 1 și 4, în raport de subunitățile „hem-globină" din molecula Hb tetramer. Coeficientul Hill, $n = 1$ indică absența totală a efectelor de cooperare (Mb, lanțuri unice „hem-globină", tetrameri cu subunități identice) și se ilustrează prin curbe de tip hiperbolă *(figura 1.109 A)*; $n > 1$ (în Hb) arată că locurile de legare ale oxigenului nu sînt independente între ele și că legarea O_2 este cooperativă;

Scanned with OKEN Scanner

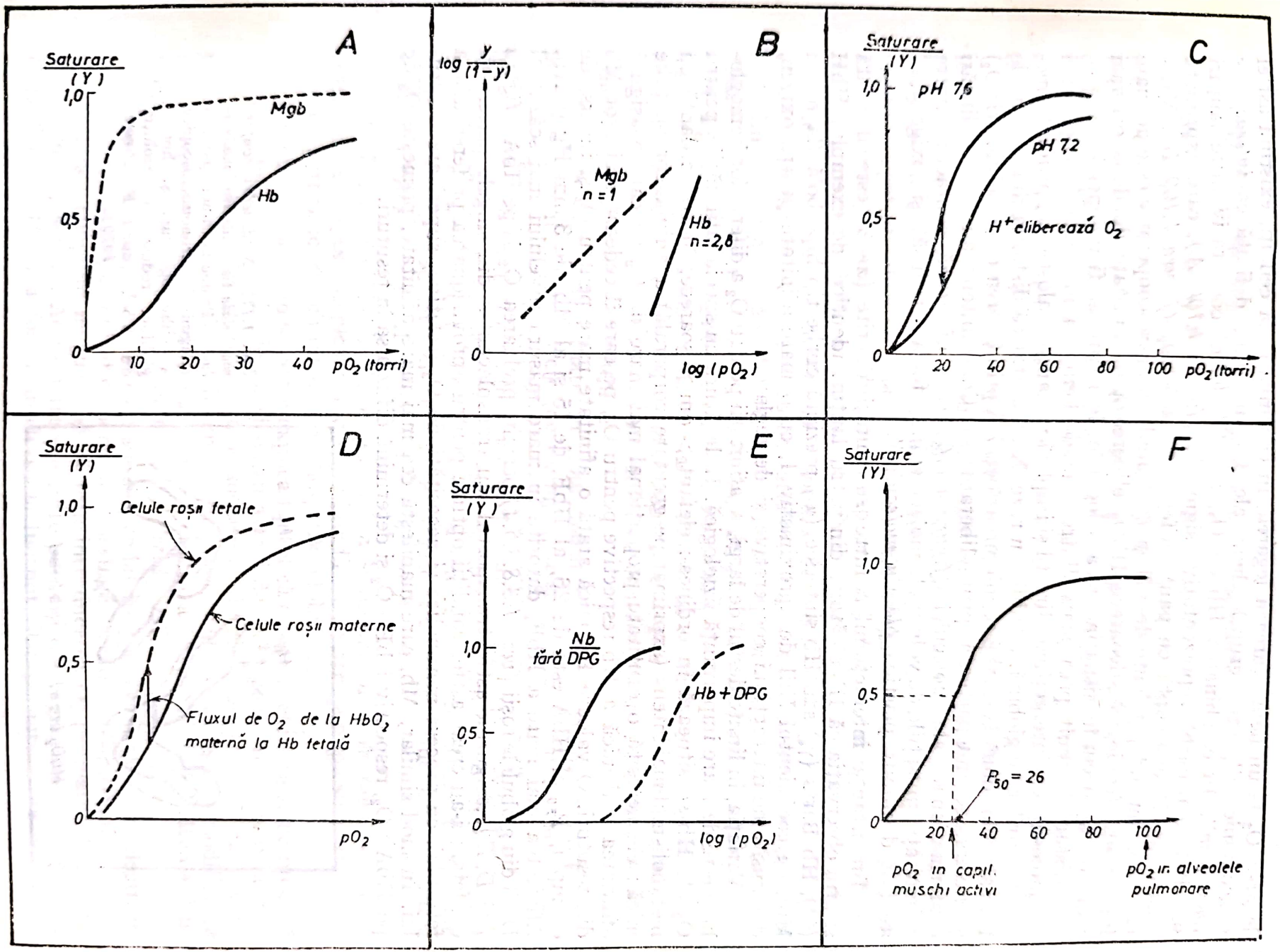


Fig. 1.109. A. Curbele de disociere ale oxigenului din hemoglobină (Hb) și mioglobină (Mgb). B. Curbele Hill pentru legarea oxigenului. C. Efectele pH-ului asupra afinității O_2 pentru hemoglobină. D. Ilustrarea afinității mai mari pentru O_2 a hemoglobinei fetale față de cea maternă. E. Efectul difosfogliceratului (DPG) de scădere a afinității O_2 pentru hemoglobină. F. Curba de disociere a HbO_2 în mușchi și alveolele pulmonare

Scanned with OKEN Scanner

legarea O_2 la un hem uşurează legarea, în continuare, la ceilalţi, existînd astfel o „comunicare" între grupele hem ale tetramerului, definită ca *interacţiune „hem-hem"*. În combinarea Hb cu O_2, $n = 2{,}8$ (efect cooperativ între lanţuri diferite) cu o curbă reprezentativă sigmoidă *(figura 1.109 A)*, care exprimată logaritmic dă o dreaptă cu panta diferită de a MbO_2 *(figura 1.109 B)*. Valorile lui n sînt independente de pH şi t^0. Modul de legare cooperativ este de mare importanţă fiziologică, deoarece HbO_2 eliberează o cantitate de două ori mai mare de O_2 decît în situaţia în care locurile de legare ar fi independente.

Distanţele mult prea mari dintre grupele hem din molecula hemoglobinei fac imposibilă o interacţiune directă şi implică mecanisme alosterice, prin intermediul lanţurilor de globină. Studiile cu raze X au arătat că distanţa dintre grupele hem ale celor două lanţuri β se micşorează cu 7 Å prin fixarea oxigenului (HbO_2) şi, invers, se îndepărtează prin eliberarea sa. Concomitent au loc modificări conformaţionale ale moleculei *(figura 1.110)* care afectează contactul dintre subunităţi; pulsaţiile de volum ale moleculei între forma „redusă" şi „oxigenată" au fost denumite plastic *„plămîn molecular"*.

Importanţa interacţiunilor între subunităţi diferite (α—β) este ilustrată şi prin observaţia că Hb alcătuite din patru lanţuri identice, de exemplu, HbH (β_4^A), Hb Barts (γ_4) sau Hb sintetice (α) prezintă curbe tip hiperbolă (la fel cu Mb), cu coeficientul Hill de aproximativ 1, cu o mare afinitate pentru oxigen, dar lipsite de interacţiuni cooperative şi de reglare.

Variaţia, în limite destul de largi, a afinităţii pentru O_2 a diferitelor hemoglobine este de mare importanţă fiziologică. În legătură cu specia, afinităţile pentru O_2 ale Hb se situează în ordinea: elefant > om > şoarece, în concordanţă cu metabolismul mai intens (exprimat pe greutate corporală) a animalelor cu talie mică; ele necesită o cantitate proporţional mai mare de O_2 pe care o asigură afinitatea mai mică a Hb respective pentru O_2, pe care îl cedează mai uşor Mb din ţesuturi. O valoare P_{50} mică arată o afinitate mare pentru O_2 şi invers, de exemplu, P_{50} al HbA este de 26, al HbF, de 15 şi al Mb, de 3 mm Hg (torri). Afinitatea mai mare a HbF, datorită în mare măsură nivelului mai scăzut al DPG din globulele roşii *(vezi 1.3.8.3.6.4)* permite preluarea O_2 de pe HbA *(figura 109 D, E)*, asigurînd astfel transportul său transplacentar din sîngele matern în cel fetal; s-au creat astfel condiţii optime pentru aprovizionarea preferenţială a fetusului, cu procese metabolice şi necesităţi de O_2 (relative) superioare adultului. În mod similar, Mb, care manifestă cea mai mare afinitate, primeşte O_2 de pe $HbA—O_2$, respectiv $HbF—O_2$ şi determină difuzia sa în ţesuturi.

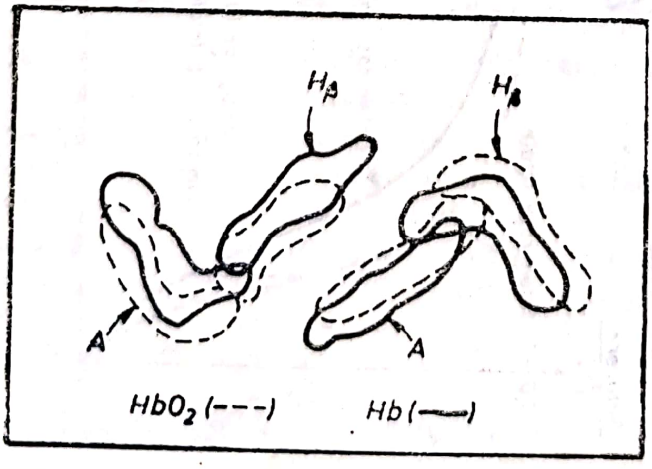


Fig. 1.110. Modificări conformaţionale în „plămînul molecular" Proiecţia unei părţi a imaginii electronomicroscopice a oxihemoglobinei şi hemoglobinei reduse la rezoluţia de 5,5 Å *(după F. Perutz, 1970)*.

1.3.8.3.6.1. Modificări conformaţionale în sistemul Hb-HbO_2

Modelul atomic al Hb (deoxi-Hb), la rezoluţia de 5,5 Å nu înregistrează modificări importante în structura internă a moleculei, dar relevă deplasări în regiunile de contact dintre subunităţile α şi β : o rotire de 9,4° pentru lanţul α şi 7,4° pentru β, ce se reflectă în apropierea, prin oxigenare, a distanţei dintre atomii de fier ataşaţi de diferitele subunităţi, cu 6,5 Å (de la 39,9 la 33,4 Å) pentru cele 2 lanţuri β şi cu o creştere de 1 Å pentru cele două lanţuri α. Aceste schimbări în aranjarea subunităţilor moleculei modifică, în moduri diferite, orientarea relativă a celor patru lanţuri.

În deoxi-Hb, His-C-terminală (HC3, 146 β) a lanţului β formează o buclă în jurul helixului *F* ; restul său imidazolic prezintă o legătură salină cu Asp (FG1, 94) a aceluiaşi lanţ β, iar grupa α—COOH se leagă salin în contactul $\alpha—\beta_2$ cu Liz (C6, 40 α). În lanţul α din Hb, Arg-C-terminală (HC3, 141 α) formează 2 legături saline cu celălalt lanţ α : prin gruparea α-COOH cu Liz (H10, 127α) şi prin gruparea guanidinică cu Asp (9, 126). Prin acest mecanism se eliberează gruparea $\alpha\text{-}NH_3^+$ a Val (Na1,1 α) N-terminale.

Modelul atomic al HbO_2, la rezoluţia de 2,8 Å *(M. F. Perutz şi colab., 1968)* confirmă, aşa cum s-a arătat anterior, că aspectul general al lanţurilor α şi β din Hb se aseamănă foarte mult cu lanţurile *m* din Mb *(J. B. Kendrew, 1962)* ; în structura tridimensională subunităţile sînt asociate între ele numai prin legături noncovalente slabe (legături saline, de H). Resturile polare ale aminoacizilor din globine sînt, în mare măsură, în contact cu solventul (microambianţa apoasă), în timp ce resturile nonpolare se găsesc, în general, îndreptate spre interiorul moleculei sau în regiunile de contact dintre subunităţi (deşi se cunosc şi numeroase excepţii).

Grupele hem sînt situate în „buzunarul hidrofob", similar pentru unele lanţuri şi diferit pentru altele (de exemplu, α şi β) . Majoritatea resturilor, în legături van der Waals cu hemul, aparţin aminoacizilor constanţi, cu poziţie invariabilă *(tabelul 1.41)*, cu rol important în arhitectonica şi funcţiile hemoglobinei *(tabelul 1.43)*. Aproape toate aceste legături sînt realizate prin interacţiunile hidrofobe cu partea nonpolară a hemului şi relevă rolul substituenţilor săi nonpolari, de exemplu restul vinil (*V*) din poziţiile 2 şi 4 ale porfirinei în stabilizarea moleculei *(Ross Fanelli A., Antonini A, Caputo A., 1964)*

ROLUL FIERULUI. Ţinta primară a schimburilor alosterice ale Hb în cursul oxigenării este deplasarea atomului de fier, care atrage după sine orientarea inelului porfirinic şi schimbările în lanţurile globinice.

La întrebarea : cum se poate explica faptul că o reacţie chimică slabă produsă de patru molecule mici de O_2 şi patru atomi de Fe^{2+} poate provoca o modificare (reajustare) atît de drastică a moleculei de Hb, comparabilă cu „patru purici care ar face să sară un elefant", cheia răspunsului se găseşte în modificarea proprietăţilor magnetice şi în examinarea atentă a hărţii lui Bill Bolton a densităţii electronilor din hemoglobină *(M. Perutz, 1974)*.

Experienţe mai vechi, în care s-a suspendat un tub cu sînge între electrozii unui electromagnet, au arătat că porţiunea de sînge „venos" (Hb) pare mai „grea" sub acţiunea cîmpului magnetic şi că prin introducerea O_2 (formarea HbO_2) ea devine mai „uşoară". Această trecere între para- şi diamagnetism *(L. Pauling, C. D. Coreyll, 1936)* a fost neînţeleasă la început, dar permite să se explice în

TABELUL 1.43

Resturile de aminoacizi care se păstrează nemodificaţi în hemoglobine şi rolul lor (I); compararea a trei lanţuri: diferenţe (II) şi identităţi (III) în helixul F 1—9

I. *Resturi de aminoacizi păstrate în hemoglobine*

Poziţie	*Aminoacid*	*Rol*
F 8	His	Histidina proximală legată de hem
E 7	His	Histidina distală din ambianţa hemului
CD 1	Phe	Contact cu hemul
F 4	Leu	Contact cu hemul
B 6	Gli	Determină apropierea strînsă a helixului B şi E
C 2	Pro	Terminarea helixului
HC 2	Tir	Determină legături încrucişate între helixul H şi F
C 4	Tre	Neprecizat
H 10	Liz	Neprecizat

II. *Diferenţe în secvenţa lanţurilor β, γ şi δ în Hb umane*

Lanţ	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9
Lanţ β	Phe	**Ala**	**Thr**	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cis
Lanţ δ	Phe	**Ser**	**Gln**	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cis
Lanţ γ	Phe	**Ala**	**Gln**	Leu	Ser	Glu	Leu	His	Cis

III. *Identităţi în secvenţa lanţurilor α şi β ale Hb umane şi ale mioglobinei de balenă (Mb)*

Lanţ	F 1	F 2	F 3	F 4	F 5	F 6	F 7	F 8	F 9
Lanţ α	Leu	Ser	Ala	**Leu**	Ser	Asp	Lis	**His**	Ala
Lanţ β	Phe	Ala	Thr	**Leu**	Ser	Glu	Leu	**His**	Cis
Mb balenă	Leu	Lis	Pro	**Leu**	Ala	Gln	Ser	**His**	Cis

prezent dublul mecanism de acţiune al Hb şi reglarea delicată a afinităţii sale faţă de oxigen, ca răspuns la necesităţile biochimico-fiziologice.

Variaţiile magnetice observate în cursul combinării Hb cu O_2 sînt *semnalele externe* ale reajustării electronilor în atomul de fier. Cînd fierul nu este legat decît cu cinci atomi învecinaţi — ca în cazul Hb reduse — doi din cei 6 electroni ai valenţelor sale ocupă orbite dirijate către legăturile chimice şi ţin la distanţă atomii învecinaţi şi astfel, atomul de fier din Hb-CO_2 este „prea mare" pentru a se insera în centura formată din cei patru atomi de N ai porfirinei şi trebuie să se plaseze, de-a latul, în direcţia unui al cincilea atom de N (din histidină). Combinarea cu O_2 forţează electronii să se deplaseze în orbitele care sînt dirijate între legături şi permit atomilor învecinaţi să se apropie de fier; fierul se „restrînge" cu 13% şi aceasta îi permite „să alunece" în planul inelului porfirinic *(figura 1.111 A)*. Ca urmare, inelul porfirinic se deplasează în raport de globină cu aproximativ 1 Å, ceea ce reprezintă, la scară atomică, o distanţă mare.

Prin acest mecanism, hemul *amplifică* mica deplasare a atomilor de fier şi o transformă într-o deplasare mare a lanţului globinic în raport de nivelul porfirinei. Această mişcare declanşează, final, reacţia de reajustare a întregii

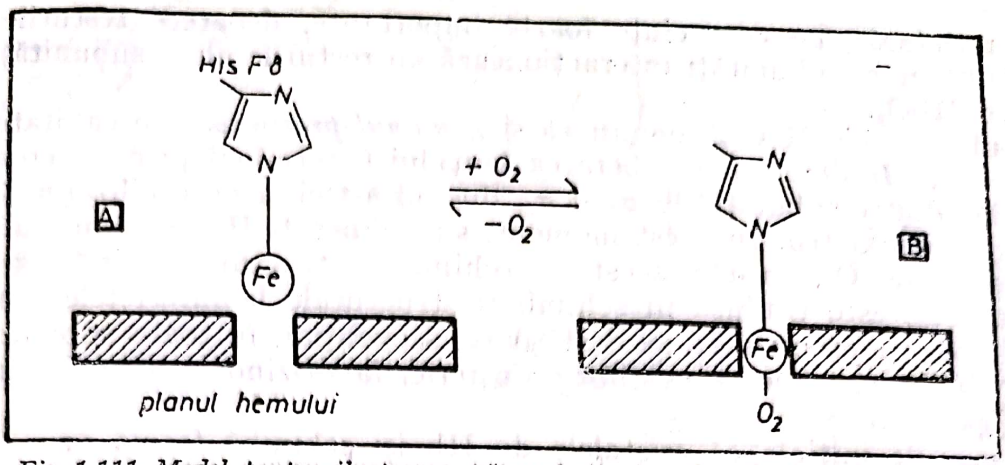


Fig. 1.111. Model pentru ilustrarea pătrunderii atomului de fier (cu 0,75 Å) în planul hemului în cursul oxigenării Hb la HbO_2. His F8 se deplasează împreună cu atomul de fier.

molecule de Hb în combinarea sa cu O_2, mecanism sugerat şi de cercetările cristalografice ale compuşilor cu fier şi porfirine *(J. L. Hoard)*. Se pare că în cursul combinării fiecărui atom de fier cu O_2 se rupe cîte o legătură salină, făcînd ca Hb să se debaraseze de unele din legăturile sale. Forma „venoasă" (Hb) se poate compara cu un „arc comprimat" ce poate trece spontan în forma „arterială" („arc descărcat"), chiar în absenţa oxigenului, în cazul în care un număr suficient de punţi saline care o ţin legată (comprimată) sînt desfăcute.

Revenind asupra aspectelor menţionate este de accentuat că în Hb atomul de fier este situat la o distanţă de 0,75 Å în afara planului porfirinei, către His F 8 proximală (de care se leagă), din cauză că raza atomului de Fe^{2+} este prea mare pentru a se plasa în centrul porfirinei. În HbO_2, atomul de fier are o rază mai mică şi de aceea se plasează în planul porfirinei, antrenînd cu sine şi restul His F 8 *(figura 1.111. B)*. În esenţă, micşorarea razei atomului de fier şi pătrunderea sa în planul porfirinei constituie *evenimentul primar* al schimbărilor structurale care stau la baza tuturor acţiunilor alosterice din molecula Hb în cursul oxigenării sale.

ROLUL LANŢURILOR GLOBINICE. Deplasarea His F 8 nu produce schimbări prea mari în structura terţiară a aceleiaşi subunităţi, dar determină o deplasare a secvenţei helicale *F* spre helixul H (către centrul moleculei) cu îngustarea cavităţii dintre ele (HF), ceea ce are ca rezultat expulzarea din cavitate a Tir HC 2 (cea mai apropiată de restul aminoacizilor terminali din toate lanţurile). Mişcarea Tir *(figura 1.112)* antrenează cu sine şi resturile adiacente

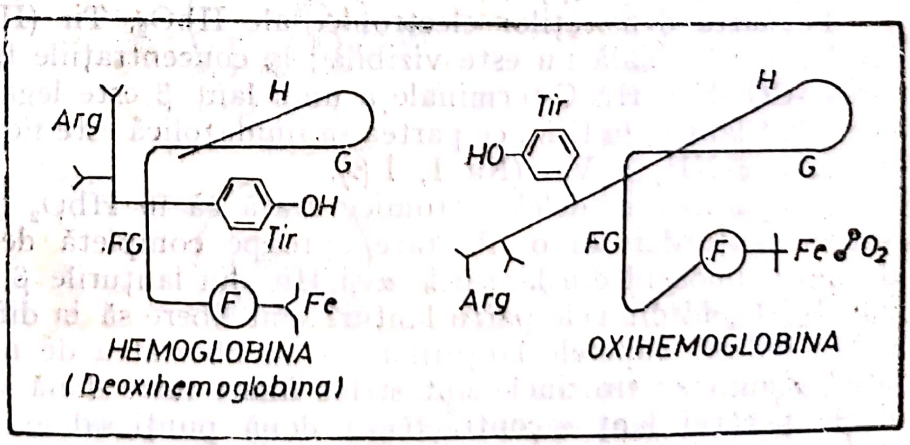


Fig. 1.112. Reprezentarea diagramatică a modificării conformaţionale a hemoglobinei prin oxigenare, cu deplasarea tirozinei şi a atomului de fier.

-COOH terminale, cu consecinţe foarte importante, deoarece resturile -COOH terminale ale unei subunităţi interacţionează cu resturile altor subunităţi în Hb dar nu în HbO_2.

Expulzarea Tir H C 2, denumită şi *„butonul-presiune"* din cavitatea dintre helixurile *F* şi *H* determină eliberarea lanţului C-terminal prin ruperea a două punţi saline dintre subunităţile α_1 şi α_2, ducînd astfel la destabilizarea structurii cuaternare a deoxi-Hb. În acest moment, sînt eliberaţi H^+, sincron cu captarea unei molecule de O_2. În felul acesta, o schimbare structurală prin oxigenare din subunitatea α_1, este tradusă în schimbări structurale la interfeţele dintre subunităţi şi face ca procesul să se desfăşoare, secvenţial, în toate subunităţile, cu modificări în constantele de echilibru alosteric, favorizînd structurile cuaternare „Oxi" *(figura 1.113)*

Observaţiile iniţiale că cristalele de Hb îşi schimbă forma prin oxigenare *(Haurowitz, 1937)* au fost completate prin urmărirea „hărţilor" densităţilor electronilor în razele X, care nu arată aspecte deosebite în cursul oxigenării Mb sau HbH (β_4), dar înregistrează modificări conformaţionale ale structurii cuaternare *(figura 1.110)* între HbO_2 de cal şi Hb de cal şi om *(M. F. Perutz, 1963, 1967)*. În paralel, se iau în considerare o serie de date de ordin chimic care relevă existenţa modificărilor produse prin oxigenare, de exemplu, în reactivitatea grupelor SH, în capacitatea de legare a unor liganzi şi în comportarea la atacul enzimelor proteolitice, acordîndu-se un rol important regiunilor -COOH terminale ale lanţurilor β, deoarece îndepărtarea acestora (chimic, enzimatic) alterează interacţiunile „hem-hem" şi modifică alura curbei de disociere, din forma sigmoidă (cooperativă) spre forma de hiperbolă (lipsa de cooperativitate).

Regiunile de contact între $\alpha_1 - \beta_1$ rămîn practic nealterate în cursul trecerii de la HbO_2 la Hb; se constată doar o rotire cu 4° a subunităţii β_1 faţă de α_1 şi o deplasare a atomilor de contact cu numai 1 Å. În schimb, contactele dintre $\alpha_1 - \beta_2$ suferă modificări remarcabile, care se traduc prin rotirea cu 13,5° a subunităţii β_2 faţă de α_1, cu o translaţie a atomilor de 1,9 Å (unii atomi se deplasează chiar cu 5,7 Å). Importanţa deosebită a acestor contacte rezultă din cîteva caracteristici: *a)* ele sînt mai mici şi mai compacte decît contactele $\alpha_1\beta_1$, permiţînd celor două subunităţi să alunece una peste alta, *b)* contactele $\alpha_1\beta_2$ sînt strîns legate cu gruparea hem care este cantonată la acest nivel, şi în consecinţă schimbările structurale în aceste regiuni afectează comportarea hemului; *c)* invariabilitatea relativă a aminoacizilor din această regiune la toate speciile şi observaţia că mutaţiile în contactele $\alpha_1\beta_2$ anulează aproape complet interacţiunile „hem-hem", efect ce nu se constată în cazul mutaţiilor aminoacizilor din contactele $\alpha_1\beta_1$.

Pe harta densităţilor electronice ale HbO_2, Tir (HC_2, 145 β) este vizibilă, dar His-C-terminală nu este vizibilă; la concentraţiile fiziologice de săruri, gruparea -COOH a His-C-terminale a unui lanţ β este legată de Liz (H 10, 132 β) a celuilalt lanţ β, în timp ce partea sa imidazolică este fie liberă, fie slab legată cu gruparea α-NH_2 a Val (Na 1, 1 β).

Compararea modelelor atomice arată că în HbO_2 capetele C-terminale ale tuturor lanţurilor au o libertate aproape completă de rotaţie, deoarece Arg, ultimul aminoacid din lanţurile α şi His din lanţurile β, precum şi Tir, penultimul aminoacid din cele patru lanţuri, sînt libere să ia diferite poziţii. În schimb, în Hb redusă, capetele lanţurilor nu au libertatea de mişcare, ele fiind „ancorate" şi anume: tirozinele sînt strîns fixate între două segmente în helix; argininele fiecărui lanţ α contractează două punţi saline cu grupările polare ale

Scanned with OKEN Scanner

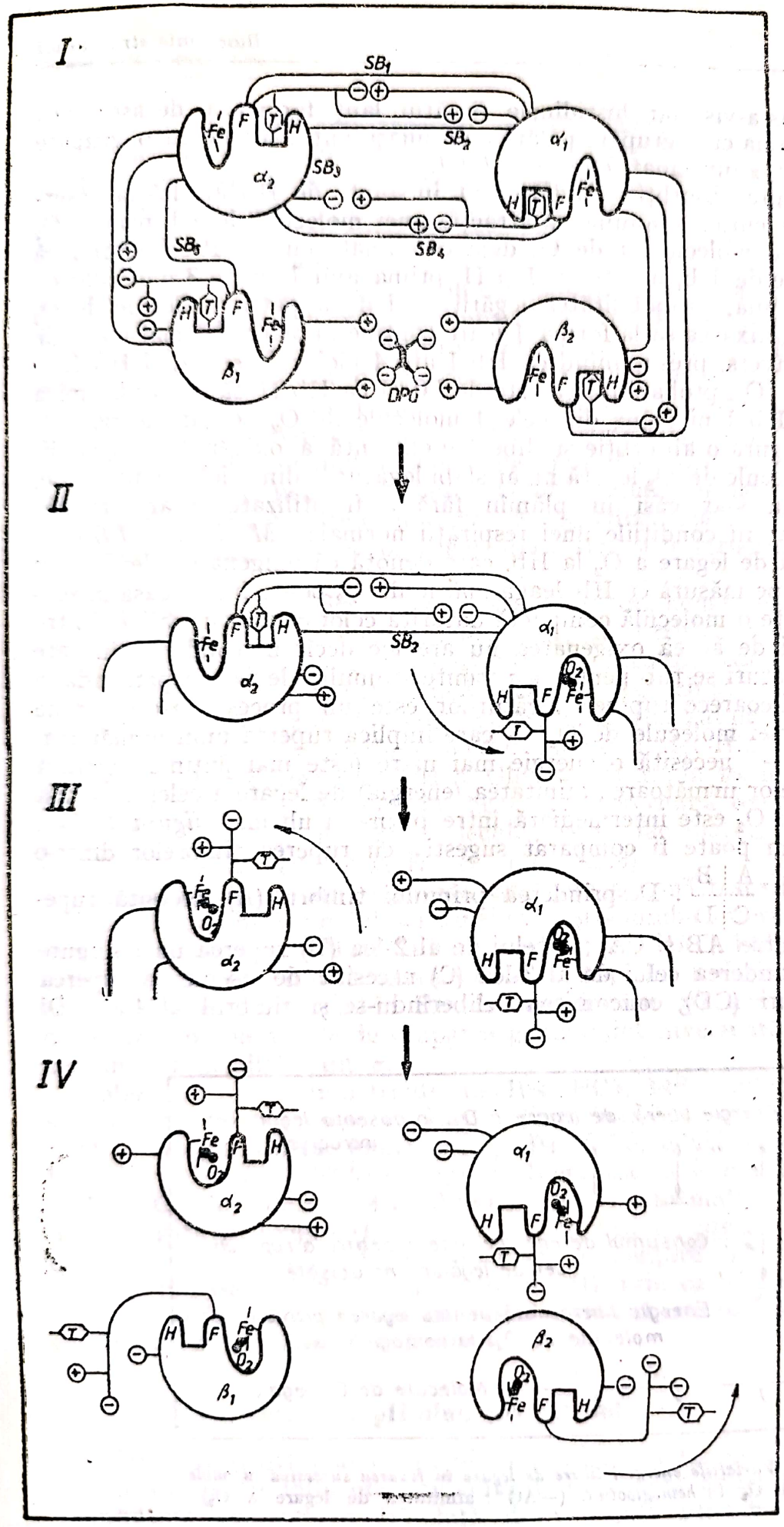


Fig. 1.113. Modificările conformaționale alosterice ale hemoglobinei în cursul oxigenării : după G. Gondoni, 1974). α_1, α_2, β_1, β_2: cele 4 subunități ale hemoglobinei; SB_1 — SB_6 ilustrează 6 punți saline; Tir = tirozina (penultimul aminoacid al lanțului C-terminal) localizată în cavitatea dintre helixul F și H (în fiecare subunitate); DPG = difosfogliceratul (cu 4 încărcări negative) menținut în cavitatea dintre subunitățile β_1 și β_2, datorită legăturilor saline cu grupările $-NH_3^+$. Hemoglobina tetramer inițială în forma deoxi (I) fixează prima moleculă de O_2 la nivelul subunității α_1; datorită diferenței razei atomice între Fe^{2+} și $Fe^{2+}: O_2$ (0,83 Å), atomul de Fe^{2+} care se găsește ușor în afara planului proteinei, prin fixarea O_2 se plasează în plan, antrenînd His de care este atașat, cu deplasarea întregului helix F spre centrul moleculei și determină astfel îngustarea cavității dintre F și H, care conține „butonul-presiune" reprezentat de către *Tir*, cu expulsarea acesteia din cavitate și eliberarea lanțului C-terminal și ruperea a 2 punți saline între α_1 și α_2 și eliberare de protoni (II). Același mecanism se produce prin legarea celei de a 2-a molecule de O_2 la subunitatea α_2, cu ruperea a încă două punți saline (III). Ruperea celor 4 din 6 punți saline, care țin legate subunitățile între ele, determină modificări ale constantelor de echilibru alosteric în forma cu structură cuaternară oxi, cu expulsarea DPG. Final, celelalte 2 subunități β_1 și β_2 captează fiecare cîte o moleculă de O_2 și eliberează protoni și molecula Hb, trece în forma total oxigenată cu structură cuaternară oxi (IV).

Scanned with OKEN Scanner

lanţurilor α de vis-a-vis, iar histidinele fiecărui lanţ formează de asemenea două punţi saline : una cu o grupare polară a aceluiaşi lanţ β şi alta cu o grupare pozitivă a unui lanţ α învecinat *(figura 1.106)*.

Cercetările asupra absorbţiei gradate a O_2 în soluţii de Hb au dus la observarea unui fenomen curios şi anume că atracţia unei molecule de Hb pentru O_2 depinde de numărul moleculelor de O_2 deja combinate cu ea. Presupunînd că avem două molecule de Hb, notate cu I şi II, prima avînd legate 3 molecule de O_2 şi a doua nici una, probabilitatea legării celei de a patra molecule de O_2 este de 70 : 1 pentru fixarea sa la forma I (care conţine numărul cel mai mare de molecule de O_2) ; invers, presupunînd că Hb I are 4 molecule de O_2 şi Hb II o singură moleculă de O_2, probabilitatea este de 70 : 1 ca Hb II să-şi piardă unica moleculă de O_2 şi Hb I nici una din cele 4 molecule de O_2 pe care le posedă. Acest mecanism asigură o absorbţie şi eliberare eficientă a oxigenului ; dacă eliberarea fiecărei molecule de O_2 legată nu ar slăbi legăturile din celelalte molecule, majoritatea acestora s-ar găsi în plămîn fără a fi utilizate şi ar produce asfixia la om, chiar în condiţiile unei respiraţii normale *(M. Perutz, 1974)*.

Curba sigmoidă de legare a O_2 la Hb, care denotă că oxigenarea devine din ce în ce mai uşoară pe măsură ce Hb leagă mai mult O_2 poate fi înţeleasă în sensul că Hb redusă este o moleculă compactă datorită celor 8 legături saline dintre cele 4 subunităţi şi de aceea oxigenarea nu are loc decît în condiţiile în care unele din aceste legături se rup pentru a permite atomului de fier să pătrundă în planul porfirinei. Deoarece ruperea legăturilor este un proces consumator de energie, fixarea primei molecule de O_2 — care implică ruperea unui număr mai mare de legături — necesită o energie mai mare (este mai puţin favorizată energetic) decît a celor următoare ; afinitatea (energia) de legare a celei de a 2-a şi a 3-a molecule de O_2 este intermediară între prima şi ultima *(figura 1.114)*.

Acest mecanism poate fi comparat sugestiv cu ruperea timbrelor dintr-o coliţă cu 4 timbre: $\begin{matrix} A & B \\ C & D \end{matrix}$. Desprinderea primului timbru (A) necesită ruperea a 2 legături (dintre AB şi CA) ; a celui de al 2-lea (B) ruperea unei singure legături (BD); desprinderea celui de al 3-lea (C) necesită de asemenea ruperea unei singure legături (CD), concomitent eliberîndu-se şi timbrul al 4-lea (D) *(L. Stryer, 1975)*.

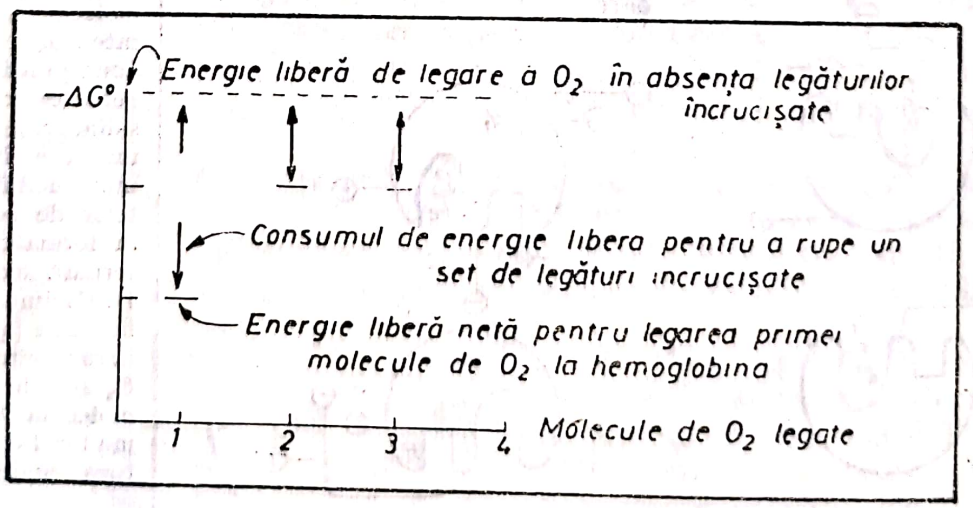


Fig. 1.114. Variaţiile energiei libere de legare în fixarea succesivă a moleculelor de O_2 în hemoglobină. (−ΔG° : afinitatea de legare a O_2)

Privind procesul sub aspectul efectelor alosterice de cooperare (enunțate de *Jacques Monod, Jeffreys Wyman și Jean-Pierre Changeux, 1965)*, în momentul cînd molecula Hb trece în forma „oxi" se produc două evenimente: *1.* punțile saline care leagă $\alpha_2 - \beta_1$ și $\alpha_1 - \beta_2$ se rup și *2.* DPG nu-și mai găsește locul în cavitatea sa (care se modifică) și este expulzat, producînd ruperea definitivă a legăturilor $\beta_1 - \beta_2$ *(a se vedea 1.3.8.3.6.4)*. În această etapă, molecula de Hb se găsește într-o stare intermediară, în care subunitățile α_1 și α_2 sînt în stare „oxi" și β_1 și β_2 în forma „deoxi". Schimbarea alosterică a structurii cuaternare către forma „oxi" are drept consecință importantă faptul că energia de activare necesară deplasării ultimelor două tirozine scade la jumătate, deoarece fiecare din aceste Tir sînt menținute în loja lor printr-o singură legătură salină, situată între His-C-terminală și Asp a aceluiași lanț β. Puntea $\alpha_1 - \beta_2$ fiind ruptă în timpul tranziției alosterice, expulzarea tirozinelor se face mai ușor și astfel afinitatea fiecărei subunități pentru O_2 este crescută. Final, ultimele două subunități β_1 și β_2 captează fiecare cîte o moleculă de O_2, eliberează protoni (H^+) și molecula trece în întregime în forma oxigenată ($Hb \cdot 4O_2$) și în structura cuaternară „oxi" *(figura 1.113)*.

Rolul His 53 α și 63 β în legarea O_2 la Fe^{2+} din hem este ilustrat și prin observația că în două hemoglobine anormale: HbM_B și HbM_S, în care ele sînt înlocuite cu Tir, absența His din aceste poziții are ca rezultat oxidarea Fe^{2+} la Fe^{3+} cu formarea Met-Hb, combinație nedisociabilă, consecință a modificării reactivității chimice a moleculei. În mod similar, înlocuirea Val învecinate (68 β) cu Glu, așa cum se găsește în HbM_{M-1} duce la formarea Met-HbM_{M-1}; în acest caz se presupune că gruparea γ-COOH a Glu (substituit în locul Val) permite stabilirea unor legături a fierului din hem care determină oxidarea sa la Fe^{3+}, cu modificări conformaționale ale moleculei, care o fac inaccesibilă enzimelor implicate în reducerea Met-Hb la Hb (vezi *1.3.8.3.8*).

Asemenea observații sugerează existența a două resturi imidazol (din His) a căror pK este în domeniul neutru și care își schimbă interacțiunile cu solventul în cursul transformării HbO_2 la Hb. În HbO_2, His (HC3, 146 β) are pK „normal", care crește în Hb datorită interacțiunii cu Asp din același lanț β. Val (Nl, 1 α) este liberă și cu pK normal în Hb, dar manifestă un pK anormal scăzut în HbO_2, din cauza apropierii sale de gruparea guanidinică învecinată, pozitivă, a Arg-C-terminale a celuilalt lanț α.

Mișcările relativ importante ale His (HC3, 146 β) aduc explicații de ordin stereochimic pentru unele constatări (anterioare) de ordin chimic. Acest rest, fixat în Hb prin interacțiunile cu Asp (94 β), împiedică accesul la gruparea reactivă -SH a Cis (FG, 93 β) și explică observația că viteza de reacție a grupelor -SH ale Cis din lanțurile β cu diferiți reactivi este mult mai mică în Hb decît în Hb legată cu oxigen (HbO_2) sau cu alți liganzi, precum și schimbarea, prin oxigenare, a semnalului *„EPR"*, cînd este influențată Cis (93 β). Gradul mic de scindare (detașare) a His-C-terminale din Hb prin carboxipeptidaza A se poate explica prin faptul că în acest caz restul terminal este mai puțin expus atacului enzimatic *(E. Antonini, M. Brunori, 1970)*.

1.3.8.3.6.2. Influența pH-ului. Efectul Bohr

Între Hb și pH apar relații reciproce: legarea H^+ prin trecerea de la HbO_2 la Hb și respectiv influența exercitată de pH asupra legării O_2 și a altor liganzi. Dependența comportării Hb față de variațiile pH-ului se ilustrează prin

efectul Bohr alcalin (peste pH ≈ 6), cînd afinitatea liganzilor, de exemplu, a O_2 (deci formarea HbO_2), creşte în paralel cu pH-ul, şi *efectul Bohr acid* (sub pH ≈ ≈ 6), cînd afinitatea pentru ligand se manifestă în sens opus, cu creşterea disocierii $HbO_2 \rightarrow Hb + O_2$. Cu alte cuvinte, scăderea pH-ului în domeniul fiziologic, de exemplu, prin acidul lactic şi carbonic (CO_2), produşi terminali ai oxidării substratelor alimentare, eliberează H^+, cu deplasarea curbei de disociere a HbO_2 spre dreapta, ilustrînd scăderea afinităţii pentru O_2, respectiv cedarea O_2 din HbO_2.

Efectul Bohr este similar pentru toate hemoglobinele mamiferelor şi pentru diferiţii liganzi, şi se manifestă, cu anumite particularităţi, în echilibrul sistemului $HbO_2 \rightleftharpoons Hb + O_2$.

În tranziţia de la HbO_2 la Hb are loc o creştere a afinităţii locurilor de legare a H^+, datorită creşterii pK a unor grupări, deoarece aceasta denotă o legare mai puternică a H^+.

Considerînd ansamblul grupelor funcţionale şi a pK-urilor resturilor de aminoacizi din proteine *(figura 1.42* şi *1.43)* şi a curbei de titrare a Hb *(figura 1.115)* rezultă că grupările libere -COOH ale Glu şi Asp au pK de aproximativ 2 şi grupările libere ale Tir, Liz, Arg, peste pK 10. Deoarece efectul Bohr (alcalin) se manifestă în domeniul pH = 6—8, implicarea acestor aminoacizi nu este probabilă şi de aceea rămîn în discuţie His, Cis şi grupele aminice terminale, a căror pK normal este în jur de 7.

Într-adevăr, numeroase date indică participarea în efectul Bohr a unui număr mic de grupări aparţinînd aminoacizilor ce ocupă poziţii identice în secvenţa diferitelor hemoglobine, de exemplu, resturile imidazolice ale His pentru efectul Bohr alcalin şi probabil a grupelor —COOH terminale pentru cel acid *(E. Antonini, 1965)* şi implicarea schimbărilor conformaţionale, care sînt esenţiale *(J. Wyman, 1964)*.

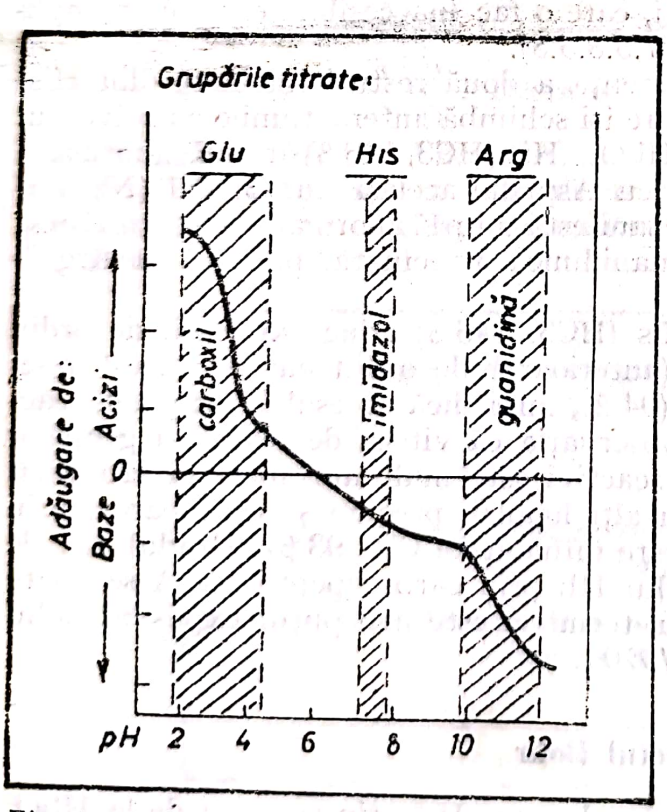


Fig. 1.115. Curba de titrare a hemoglobinei (după E. Hoffmann, 1975) Zonele punctate indică domeniile de tamponare.

Blocarea cu cianat a grupelor α-NH_2 terminale: $R—NH_2 + {}^-NCO + H^+ \rightarrow R—NH—CO—NH_2$, cu formarea derivaţilor carbamoilaţi, care nu mai leagă H^+, arată că efectul Bohr nu este afectat în cazul blocării unui singur lanţ β, dar scade semnificativ prin blocarea lanţului α; blocarea sau îndepărtarea grupelor α-NH_2 terminale ale celor patru lanţuri scade cu 15—25% efectul Bohr.

Studiile cu raze X arată implicarea His-C-terminale (146 β) în efectul Bohr, dovedită prin observaţia că Hb lipsită de acest aminoacid în lanţurile β (de exemplu, prin îndepărtarea cu ajutorul carboxipeptidazei B, enzimă proteolitică specifică pentru scindarea legăturilor peptidice dintre

aminoacizii bazici C-terminali din același lanț) manifestă numai jumătate din efectul Bohr normal al Hb (0,35 H^+ legați per mol. O_2, față de valoarea normală de 0,7 H^+), sugerînd astfel rolul important al His (146) din ambele lanțuri β în efectul Bohr. Această participare se poate ilustra prin imaginile cu raze X care arată că în HbO_2, His-146 β se rotește liber, în timp ce în Hb redusă acest rest terminal este antrenat într-un număr de interacțiuni de importanță specială prin legarea restului său imidazolic cu Asp-94 din același lanț β. Apropierea de acest rest încărcat negativ crește pK-ul, respectiv protonarea, His-146 β în Hb (dar nu în HbO_2) și astfel, prin trecerea de la HbO_2 la Hb apare o mai mare afinitate pentru legarea H^+ din cauza modificării încărcării mediului înconjurător. Ambianța grupelor α-NH_2 ale lanțurilor α suferă modificări similare în cursul deoxigenării; în HbO_2 aceste grupări sînt libere, în timp ce în Hb redusă, grupările α-NH_2 ale unui lanț α interacționează cu grupele —COOH terminale ale celuilalt lanț. Vecinătatea resturilor —COOH încărcate negativ din Hb crește afinitatea grupărilor aminice terminale pentru H^+ și sugerează implicarea în efectul Bohr a unei a treia grupări, His-122 din lanțul α.

Informații utile s-au obținut prin studiul liganzilor cu intermediari artificiali de tip α β_2 sau $\alpha_2\beta$ în care un lanț este menținut în stare legată (X) și astfel numai lanțul partener poate reacționa cu ligandul. Spre deosebire de lanțurile izolate — care nu manifestă efectul Bohr — aceștia se comportă similar cu Hb tetramer și confirmă că atît lanțurile α cît și cele β contribuie, în mod egal, la efectul Bohr alcalin. În cazul efectului Bohr acid, situația apare diferită deoarece intermediarii $\alpha_2\beta$ sînt lipsiți de efect.

În interpretările stereochimice *(M. Perutz și colab., G. Antonini, M. Brunori)* se acordă atenție studiilor de scurtare a capetelor C-terminale ale lanțurilor α și β și comportării grupării —SH din Cis 93β față de diferiții agenți care scad efectul Bohr. Se consideră astfel că aproximativ 1/2 din efectul Bohr alcalin se datorește schimbării pK-ului grupelor imidazolice ale His din capătul C-terminal al lanțurilor β, care au o valoare „normală" în Hb cu liganzi (de exemplu, HbO_2) și foarte ridicată în Hb redusă (fără liganzi); 1/4 din efect se atribuie schimbării pK a grupelor α-NH_2 din lanțul α. Nu s-a reușit să se stabilească exact cui se datorește restul de 1/4 a efectului Bohr alcalin și nici grupele responsabile de efectul Bohr acid, dar se presupune în acest caz implicarea grupelor —COOH ale Asp-94 β.

1.3.8.3.6.3. Efectul CO_2. Carboxiaminohemoglobina (Hb—CO_2)

O poziție deosebită în efectul Bohr revine CO_2 care are, pe de o parte, un efect specific asupra echilibrului $HbO_2 \rightleftharpoons Hb + O_2$, și, pe de altă parte, se leagă diferit de Hb și $HbO_2 \cdot CO_2$, la fel cu H^+ și DPG *(vezi 1.3.8.3.6.4)* scade afinitatea Hb pentru O_2, dar, în timp ce un număr mare de H^+ favorizează combinarea DPG la Hb, CO_2 se comportă invers, intrînd în competiție cu DPG și cu ionii de H^+.

Importanța deosebită a acestui proces rezultă din rolul său în transportul CO_2, deoarece aproximativ 60% din CO_2 format (schimbat) în organism este transportat prin sistemul Hb. La pH și pCO_2 constante, Hb redusă umană leagă cantități mai mari de CO_2 (0,40 moli CO_2/mol hem) decît HbO_2 (0,15 moli CO_2/mol hem). În consecință, țesuturile cu metabolism intens (de exemplu, mușchii contractili), care produc cantități mari de CO_2 și alți acizi (de exemplu,

Scanned with OKEN Scanner

acid lactic), CO_2 și H^+ din capilare (țesulare) determină descompunerea HbO_2 cu eliberarea O_2, prin care se asigură necesitățile metabolice ale țesuturilor. La nivelul capilarelor plămînilor are loc procesul invers; pO_2 mai ridicate îndepărtează H^+ și CO_2 de pe Hb, cu formarea concomitentă a HbO_2, deși acești liganzi ocupă locuri diferite în molecula Hb.

În mod simplificat aceste procese (efect Bohr) pot fi ilustrate în felul următor:

$$\underline{|\ HbO_2 + H^+ + CO_2\ |}$$

în țesuturile metabolic active ↓ ↑ în alveolele pulmonare

$$\left|\ Hb\begin{matrix}H^+\\ \\ CO_2\end{matrix} + O_2\ \right|$$

CO_2 se combină cu grupele $-NH_2$ situate la începutul lanțurilor de globină *(J. Kilmartin, L. Rossi—Benardi)*, dar nu se știe exact de ce Hb are o afinitate mai mare pentru CO_2 decît HbO_2. Mecanismul efectului biochimic specific al CO_2 implică formarea unor compuși *carbaminici* cu grupele α-NH_2 (neîncărcate) după o reacție în două etape:

$$a)\ R{-}NH_3^+ \rightleftharpoons R{-}NH_2 + H^+$$

$$b)\ R{-}NH_2 + CO_2 \rightleftharpoons R{-}NH{-}COO^- + H^+$$

Deoarece CO_2 reacționează numai cu grupele α-NH_2 neîncărcate, cantitatea de carbamat formată depinde de pK-ul acestor grupări aminice, situat între 7—8; se consideră astfel că la pH 7,3 o fracțiune apreciabilă a acestora este în stare nonionizată și deci capabilă să formeze compuși carbaminici. Din observația că blocarea cu CN^- a grupelor terminale a celor patru lanțuri (α_2, β_2) face să dispară efectul CO_2 asupra echilibrului $HbO_2 \rightleftharpoons Hb + O_2$ și că afectarea a numai două lanțuri reduce efectul la jumătate, rezultă implicarea tuturor celor patru grupări $-NH_2$ terminale în legarea CO_2.

1.3.8.3.6.4. Efectul difosfogliceratului (DPG)

Afinitatea mai mică a O_2 pentru Hb din globulele roșii față de o soluție cu un conținut identic de Hb pură, a condus la ideea existenței unui al treilea compus (parte integrantă din complexul HbO_2) responsabil de acest efect *(J. Barcoft, 1921)*, ulterior *(Reinhold Benesch, Ruth Benesch, 1967)* identificat cu *2,3-difosfogliceratul (DPG)* cu formula:

$$\begin{matrix}COO^-\\ |\\ H{-}C{-}O{-}PO_3^{2-}\\ |\\ H_2C{-}O{-}PO_3^{2-}\end{matrix}$$

În ansamblu, afinitatea Hb pentru H^+, DPG și CO_2 crește pe măsură ce O_2 se eliberează.

În prezența DPG din globulele roșii ale omului și ale altor specii — în care se găsește normal în concentrații moleculare similare cu $Hb{-}P_{50}$ al Hb

crește la 26 torii, față de 1 torr (în absența DPG), ceea ce indică scăderea de 26 ori a afinității O_2 pentru Hb *(figura 109 E)*. Este important că DPG se leagă numai cu Hb redusă și nu cu HbO_2 și că legarea O_2 și DPG la Hb este mutual exclusivă. Fixarea O_2 la Hb în prezența DPG poate fi ilustrată prin ecuația :

$$Hb{-}DPG + 4O_2 \rightleftharpoons Hb(O_2)_4 + DPG$$

DPG creează un „crampon" electrostatic între 2 subunități β, care se combină numai în Hb redusă și trebuie expulzat în momentul în care molecula de Hb trece în forma HbO_2. Într-o soluție neutră, acest crampon poartă echivalentul a 4 încărcări negative care se leagă la 4 încărcări pozitive, cîte 2 pentru fiecare subunitate β, în cavitatea centrală a Hb. În forma redusă (Hb) aceste încărcări + sînt aranjate în așa fel încît permit „acomodarea" moleculei de DPG. Modelul se poate asemăna cu o priză electrică (Hb) care coincide cu fișele ștecherului (DPG); această coincidență se pierde prin trecerea Hb la forma HbO_2 și astfel DPG (ștecherul) nu se mai potrivește prizei și „cade".

În privința legării DPG este de menționat stereochimia interesantă a acestui mecanism biochimic, în sensul că Hb (alcătuită din patru subunități) posedă două locuri de legare pentru moleculele mici, dintre care una, situată pe axa de simetrie a moleculei Hb, în cavitatea centrală, servește legării DPG, în raport de mol/mol. La locul de legare al DPG participă resturile încărcate puternic pozitiv: grupele $\alpha\text{-}NH_3^+$ ale Liz EF-6 și His H-21 din ambele lanțuri β, care interacționează cu DPG, încărcat puternic, cu 4 grupări negative, la pH fiziologic. DPG este stereochimic complementar unei constelații de 6 grupări încărcate pozitiv din lanțurile β, îndreptate spre cavitatea centrală a moleculei de Hb *(figura 1.116)*.

Absența His H-21 din HbF explică legarea mai slabă a DPG la hemoglobina fetală și afinitatea mai mare pentru O_2.

În timpul oxigenării are loc o micșorare a spațiului, prin apropierea helixului H al lanțului β_1, ceea ce are ca urmare distanțarea grupărilor $\alpha\text{-}NH_2$ de la 16 la 20 Å ceea ce nu mai permite contactele cu resturile fosfat din DPG și se produce astfel „eliminarea" DPG. În acest mod se explică efectul de scădere prin DPG a afinității O_2 pentru Hb prin stabilizarea structurii cuaternare a Hb reduse datorită legăturilor încrucișate între lanțurile β. Hb redusă posedă 8 legături saline ce implică resturile —COOH terminale

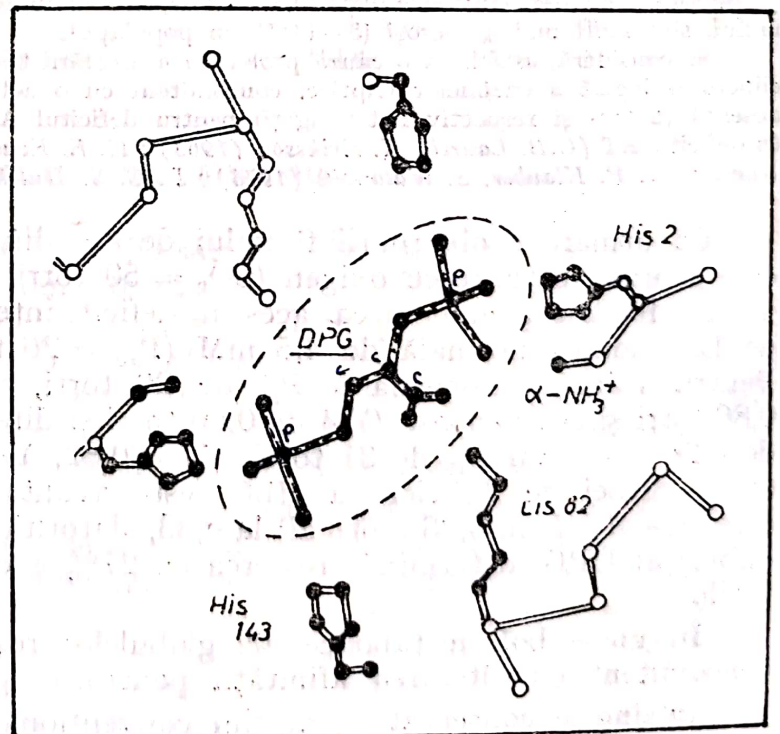


Fig. 1.116. Modelul legării 2,3-difosfogliceratului (DPG) în „cavitatea" oxihemoglobinei (HbO_2) umană.

și care se rup în cursul oxigenării *(vezi 1.3.8.3.6.1)*; DPG contribuie, prin legături încrucișate *adiționale*, care de asemenea trebuie să se rupă în cursul oxigenării și, în consecință, afinitatea O_2 pentru Hb este scăzută prin prezența (legarea) DPG.

Efectul DPG prezintă un mare interes pentru o serie de procese fiziologice, patologice și în conservarea sîngelui, ca de exemplu comparativ cu Hb A, hemoglobina fetală (HbF) leagă (așa cum s-a menționat) mai puțin DPG; apare astfel o explicație pentru afinitatea mai mare a HbF pentru O_2 (legarea O_2 și DPG fiind competitive) și respectiv pentru aprovizionarea preferențială a fetusului cu oxigen *(figura 1.109 D)*. O problemă interesantă în fiziologia respirației este mecanismul adaptativ ce apare la persoanele care își schimbă locul, de la o altitudine la alta. Deplasarea de la nivelul mării la altitudini ridicate este însoțită de o scădere a afinității față de O_2, concomitent cu creșterea nivelului DPG din globulele roșii și, invers, în cazul coborîrii locuitorilor de la munte la nivelul mării. Acest mecanism de adaptare este foarte rapid, $T^1/_2$ a schimbării în nivelul DPG și a afinității pentru O_2 fiind de 6 ore. Efectul DPG aduce explicații și asupra mecanismelor adaptative implicate în tulburarea oxigenării țesuturilor (hipoxie) în cazuri patologice. Pentru exemplificare se poate considera *emfizemul pulmonar obstructiv*.

În patogenia emfizemului (familial) se menționează și mecanisme biochimico-enzimatice. Se știe că leucocitele și macrofagii eliberează endoproteaze (triptice) care, în condiții normale, digeră debriurile inflamatorii, dar, în anumite condiții, ele pot să atace și țesuturile, de exemplu, membranele alveolare ale plămînului; factorii externi, (fumatul) par a stimula eliberarea acestor enzime triptice din leucocite. În țesuturile vii, efectul endoproteazelor este contracarat de inhibitorii enzimatici, dintre care cel mai important este α_1-antitripsina sau „AAT", care permite digerarea debriurilor inflamatorii, dar protejează alveolele pulmonare de atacul proteazelor triptice. În condițiile unei anomalii (deficit) a producerii AAT (α_1-globulină), ce se transmite mendelian, printr-o genă autozomal recesivă, are loc distrugerea membranelor alveolare cu producerea emfizemului; dacă frecvența homozigoților AAT deficienți este mică (0,1—0,2%), în schimb heterozigoții, de asemenea expuși emfizemului, sînt mult mai numeroși (5—14% din populație).

Se consideră, astfel, ca o cauză probabilă a afectării țesutului pulmonar asociată cu emfizemul, eliberarea locală a enzimelor triptice, concomitent cu o activitate antitriptică (AAT) scăzută sau absentă (homo- și respectiv heterozigoții pentru deficitul AAT); riscul apare crescut la fumătorii cu deficit AAT *[C.B. Laurell, K. Eriksson (1963); H. E. Evans, M. Levi, I. Mandi (1970); R.E. Kanner, M. R. Klauber, S. Watanabe (1973); D. C. S. Hutchinson (1973); J. Lieberman (1973)]*.

Ca urmare a obstruării fluxului de aer din bronchiole, sîngele arterial nu este complet saturat cu oxigen ($pO_2 = 50$ torri, jumătate din valoarea sa normală). Pentru compensarea acestui deficit intervine creșterea nivelului DPG de la valoarea normală de 4,5 mM ($P_{50} = 26$ torri) la 8 mM ($P_{50} = 31$ torri). Pentru valoarea normală a P_{50} de 26 torri, saturarea arterială (Y_A) este de 0,86 torri și cea venoasă (Y_V) de 0,60 torri și diferența saturării cu oxigen (ΔY) de 0,26; în cazul P_{50} de 31 torri, $Y_A = 0{,}82$, $Y_V = 0{,}49$ și $\Delta Y = 0{,}33$. Modificarea curbei de disociere a HbO_2 este avantajoasă acestor pacienți deoarece creșterea A de la 0,26 (normal) la 0,33, datorită nivelului mai ridicat (aproape dublu) al DPG, determină creșterea cu 27% a cantității de oxigen oferit țesuturilor.

În unele boli metabolice ale globulelor roșii, nivelul DPG este anormal, concomitent cu alterarea afinității pentru oxigen.

În sîngele conservat în mediul convențional „ACD" (acid citric — citrat — dextroză = glucoză) se observă creșterea, în decurs de 10 zile, a afinității pentru oxigen de la $P_{50} = 26$ torri la 18 torri; concomitent are loc scăderea nive-

lului DPG de la 4,5 mM (normal) la 0,5 mM. Administrarea cantităţilor mari dintr-un asemenea sînge conservat, cu un nivel mai scăzut de DPG şi cu o afinitate crescută pentru O_2, poate compromite oxigenarea tisulară. La persoanele sănătoase, globulele roşii lipsite de DPG îşi refac 1/2 din nivelul normal al acestuia în decurs de 24 ore, dar la bolnavii gravi, această refacere este mult mai lentă şi de aceea este necesară administrarea, la asemenea pacienţi, a sîngelui cu un nivel normal al DPG. Adăugarea DPG nu creşte cantitatea sa din globula roşie, deoarece membrana eritrocitului nu este permeabilă pentru această moleculă puternic încărcată; în schimb, se poate evita scăderea nivelului DPG din sîngele conservat, prin adăugare de inozină, care pătrunde în globulele roşii, unde se integrează într-o serie de reacţii metabolice care conduc la formarea DPG *(L. Stryer, 1975)*.

1.3.8.3.6.5. **Interacţiuni cu anticorpii şi haptoglobina**

Tehnica fixării cantitative a complementului a contribuit la stabilirea unor importante proprietăţi imunochimice ale Hb, cu relevarea unor diferenţe între Hb şi HbO_2, ce concordă cu ansamblul informaţiilor asupra modificărilor structurale produse de liganzi.

Reactivitatea populaţiilor de anticorpi apare specifică pentru dimeri ($\alpha\beta$); lanţurile izolate sînt lipsite de această proprietate. Persistenţa reacţiei în soluţii foarte diluate (10^{-9} M de Hb) sugerează că şi la această diluţie extremă, un număr important de molecule se află în stare de dimeri.

Comportarea faţă de haptoglobină (Hpg), similară reacţiei cu anticorpii, a condus la următoarele constatări: Hpg se leagă numai cu Hb ce conţine liganzi, de exemplu, cu HbO_2; afinitatea pentru aceasta este atît de mare încît reacţia este practic ireversibilă; lanţurile izolate β leagă Hpg şi cînd conţin şi cînd nu conţin liganzi, dar afinitatea este mult mai mică decît pentru HbO_2; lanţul α are o afinitate mai mare decît β *(G. Antonini, M. Brunori, 1970)*.

1.3.8.3.7. EFECTUL CO. CARBOXIHEMOGLOBINA (HbCO)

Carboxihemoglobina (HbCO, Hb—CO sau CO—Hb) se formează prin legarea coordinativă a CO la fierul hemului. Reacţia este reversibilă, dar afinitatea Hb faţă de CO este de 210—230 de ori mai mare decît pentru ligandul fiziologic (O_2) şi de aceea, dacă saturarea 50% a Hb se produce la o presiune parţială de 30 mmHg de O_2, în cazul CO, semisaturarea are loc la numai 0,12 mm Hg CO, cînd jumătate din Hb devine nefuncţională. De asemenea, afinitatea CO pentru mioglobină (Mb) este chiar mai mare decît pentru Hb.

Problema este de un mare interes pentru sanogeneză şi trebuie privită în raport de doi parametri majori: concentraţia CO din aerul inspirat şi timpul de expunere care, împreună, determină gradul de saturare al Hb din organism cu oxid de carbon. Se consideră că o concentraţie în atmosferă de aproximativ 20 ppm (ppm = părţi pentru milion) de CO, întîlnită pe străzile cu circulaţie intensă de maşini, este fără repercusiuni grave asupra organismului; concentraţiile maxime admisibile în mediul industrial erau considerate de 100 ppm dar în prezent au fost reduse la 50 ppm, deoarece contactul cu o atmosferă ce conţine 1 parte CO la 100.000 părţi aer (10 ppm) nu este periculoasă timp de

Scanned with OKEN Scanner

3 ore, dar poate avea consecinţe grave la o expunere mai îndelungată; unele normative prevăd ca nivel maxim acceptabil doar 9 ppm [*US Dept. of Health, Education and Welfare (1975)*].

Privind problema sub aspectul gradului de saturare a Hb din organismul uman cu CO, se consideră că pînă la o concentraţie de 10% HbCO nu apar simptome caracteristice (deşi se citează afectarea acuităţii mintale); între 10—30%, se înregistrează cefaleea, care se intensifică la concentraţii de 30—50%, cînd apar şi confuzii mintale, greaţă, vomă, accelerarea pulsului şi eventual comă; între 50—60%, apar convulsii, hiperreflexie (şi eventual coma); între 60—70% apare şocul, insuficienţa respiratorie şi moartea; la concentraţii de 80—90% HbCO, moartea survine în cîteva minute.

În *figura 1.117*, se prezintă o diagramă care ilustrează raportul dintre concentraţiile CO din atmosferă şi apariţia diferitelor simptome clinice, în raport cu timpul de expunere. Este de menţionat că fumatul creşte cu 3—10% cantitatea de CO inhalat (vezi 1.3.8.3.7.1); că munca fizică, anemia şi metabolismul crescut agravează efectul CO asupra organismului. Bătrînii, debilii, astenicii sînt mai sensibili, dar pentru aceeaşi grupă există sensibilităţi individuale speciale; la unele persoane chiar o concentraţie de 40% HbCO din sînge poate fi fatală.

Poluarea tot mai intensă cu CO, în special ca urmare a formării sale prin combustia carburanţilor din autovehicule (dovedită prin semnele de intoxicare şi moartea animalelor de experienţă ţinute pe străzile cu circulaţie supraaglomerată de autovehicule), înregistrarea unui număr relativ mare de decese la persoanele care lucrează în garaje închise şi efectul cumulativ al CO, impun măsuri de ordin tehnic-igienic care să evite efectul nociv asupra organismului cauzat de creşterea concentraţiei CO din atmosfera oraşelor.

1.3.8.3.7.1. Fumatul şi oxidul de carbon

Efectul fumatului trebuie privit sub dublu aspect: asupra celui care fumează şi asupra fumătorilor „involuntari" sau „pasivi" care nu fumează, dar vin în contact cu ambianţa viciată prin combustia tutunului. De aceea se ia în considerare fumul „colateral" ce se produce prin arderea ţigării (chiar cînd aceasta arde singură) şi fumul „principal", inhalat de fumător care are primul efect

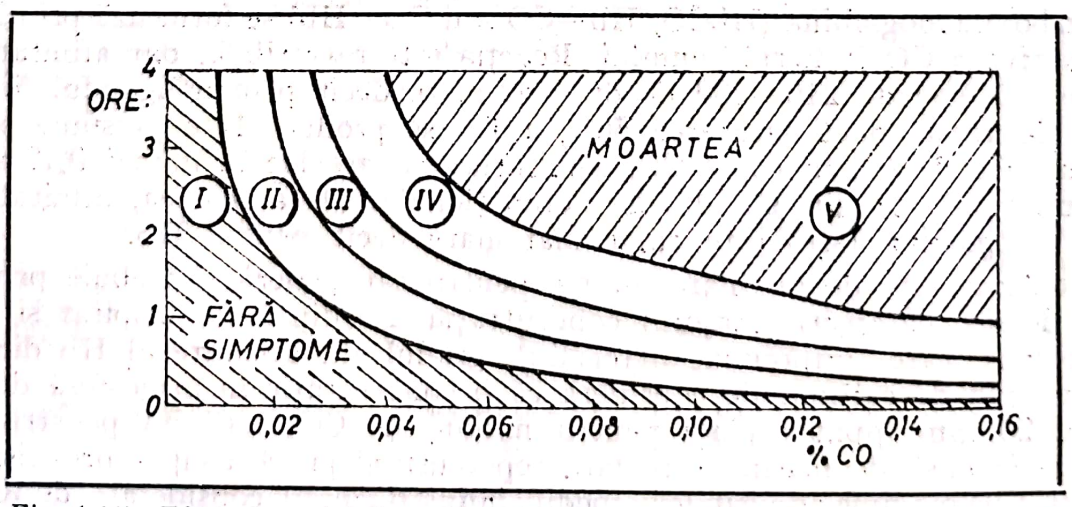


Fig. 1.117. Efectele intoxicării cu oxid de carbon. I. fără simptome caracteristice II. simptome minore III. cefalee, greaţă IV. simptome care denotă efecte toxice grave V. moartea

asupra acestuia, dar, care, după expirare, apare de asemenea în mediul ambiant, adică în fumul „colateral". Efectul asupra nefumătorilor depinde de volumul spațiului (cameră, cabine, interiorul autovehiculelor, avioanelor etc.) și de gradul de ventilare. Este important de precizat că fumul „colateral" conține cantități mai mari de substanțe potențial nocive decît fumul „principal" inhalat direct de fumător, așa cum se ilustrează în *tabelul 1.44* din care se pot reține concentrațiile de 3 ori mai mari ale 3,4-benzpirenului (suspectat a fi cancerigen), de cadmiu (incriminat ca agent posibil etiologic în dezvoltarea bolii obstructive cronice pulmonare și în hipertensiune), de 5 ori mai mare de CO și de aproximativ 50 de ori mai mare de amoniac.

TABELUL 1.44

Compararea fumului „principal" și „secundar" produs de țigarete /după W. H. Frishman (1979)/

CARACTERISTICI/COMPONENȚI	PRINCIPAL (mg/țig.)	SECUNDAR (mg/țig.)	RAPORT: SECUNDAR/ PRINCIPAL
Caracteristici generale:			
Durata producerii fumului	20 sec.	550 sec.	27
Tutun ars	347	411	1,2
Particule/țigară	$1{,}05 \times 10^{12}$	$3{,}5 \times 10^{12}$	3,4
Componenții fazei particulate:			
Gudroane (extract cloroformic) — obișnuite	20,8	44,1	2,1
Idem — filtru	10,2	34,5	3,4
Nicotină — obișnuite	0,92	1,69	1,8
Idem — filtru	0,46	1,27	2,8
Benzo(a)piren	$3{,}5 \times 10^{-5}$	$13{,}5 \times 10^{-5}$	3,7
Piren	13×10^{-5}	39×10^{-5}	3,0
Fenoli totali	0,228	0,603	2,6
Cadmiu	$12{,}5 \times 10^{-5}$	45×10^{-5}	3,6
Gaze și vapori			
Apa	75,	298	39,7
Amoniac	0,16	7,4	46
Oxid de carbon	31,4	148	4,7
Bioxid de carbon	63,5	79,5	1,3
Oxizi de azot	0,014	0,051	3,6

Nivelul CO din locurile unde se fumează, în raport cu numărul de țigări, volumul spațiului și ventilație, se situează între 2—110 ppm; în condițiile de fumat intens, spațiu mic și ventilație insuficientă, concentrația sa depășește nivelul expunerii industriale maxime admise pentru 8 ore, de 50 ppm, dar, și în condiții de ventilație adecvată depășește nivelul maxim acceptabil de 9 ppm; în paralel, nivelul HbCO din sîngele nefumătorilor crește de la valoarea normală de 1,2—2% la 5%. În general, asemenea concentrații nu prezintă inconveniente pentru persoanele sănătoase. În schimb, expunerea timp de 2 ore într-o încăpere insuficient ventilată în care s-au fumat 15 țigări, micșorează toleranța la exerciții (efort), la pacienții cu claudicație intermitentă și la bolnavii cu angină pectorală, la care agravează și tulburările cardio-circulatorii și declanșează apariția crizelor dureroase. Este de remarcat în mod deosebit situația fumătorilor care lucrează în mediu industrial cu nivel ridicat de CO, la care efectele se cumulează (prelungirea timpului de inhalare, chiar la dublu).

În privința nicotinei, deși concentrația sa depășește în încăperile în care se fumează limitele maxime admise pentru expunerea industrială (500 $\mu g/m^3$) atingînd valori de peste 1.000 $\mu g/m^3$, ea pare a favoriza producerea bolilor aterosclerotice cardiovasculare numai la fumători (inhalare directă) și nu ar afecta fumătorii „involuntari" la care nivelul de absorbție este de numai 1% față de fumătorii activi. Efectele *cronice* ale fumatului, urmărite experimental (șoareci, 1—2 ani; iepuri, 2—5 ani), relevă producerea la aceștia a emfizemului și dezvoltarea aterosclerozei; asemenea date permit să se presupună, deși nu există o certitudine, producerea unor efecte similare asupra fumătorilor involuntari *(W. H. Frishan, 1979)*.

Scanned with OKEN Scanner

1.3.8.3.8. METHEMOGLOBINA (Met-Hb, MetHb)

Sub acţiunea oxidanţilor, Fe^{2+} din Hb trece la Fe^{3+}, cu formarea methemoglobinei (Met-Hb), lipsită de capacitatea de transport reversibil al O_2. Met-Hb se formează în mod continuu şi fiziologic în eritrocite dar este rapid redusă, astfel încît echilibrul Hb ⇌ Met-Hb este puternic deplasat spre stînga şi nu permite, normal, acumularea Met-Hb peste 0,4—1% din totalul compuşilor cu hem. Reducerea este efectuată de *methemoglobinreductaze* (două sisteme enzimatice), cuplate cu procesele de metabolizare ale glucozei *(figura 1.118)*.

Cea mai importantă este *NADH-methemoglobinreductaza I* (diaforaza; diaforaza I; NADH-diaforaza; NADH-ferri-hemoglobin-oxidoreductaza sau lipoamid-dehidrogenaza), enzimă reducătoare fiziologică, responsabilă de reducerea a 70% din Met-Hb formată, cu ajutorul donorului de electroni (hidrogen) *NADH* (cofactor) format în glicoliza anaerobă *(Calea Embden—Meyerhof—Parnas, „EMP")*. Cealaltă enzimă, *NADPH-methemoglobinreductaza II* (diaforaza II) realizează reducerea intercorpusculară a aproximativ 5% din Met-Hb şi necesită drept cofactor *NADPH*, format pe calea metabolizării oxidative a glucozei, prin ciclul pentozofosfaţilor (Calea Warburg—Dickens—Horecker sau şuntul hexozomonofosfaţilor „HMP"). Ea este considerată ca un fel de enzimă de „rezervă", ce necesită prezenţa unor agenţi reducători puternici (de exemplu,

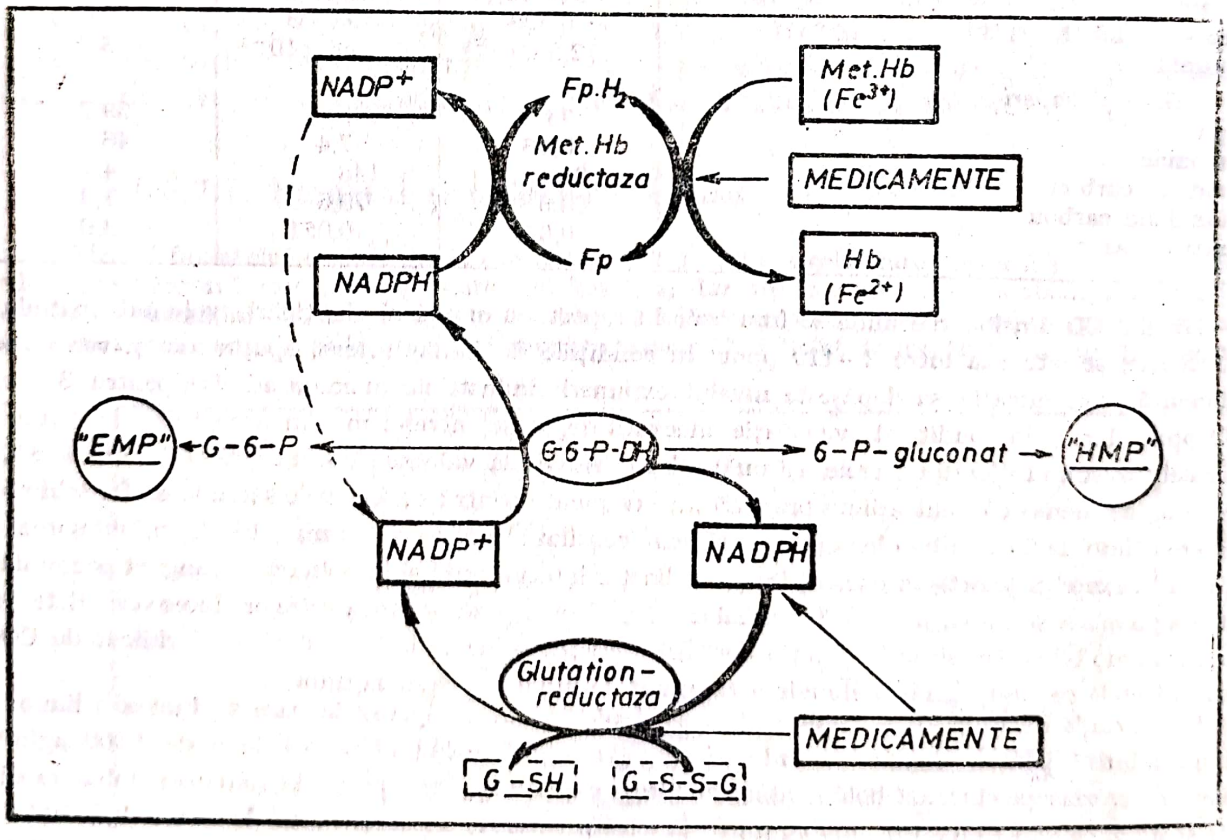


Fig. 1.118. *Poziţia methemoglobinreductazei în transformarea methemoglobinei (Met. Hb) în hemoglobină (Hb) şi blocarea reacţiilor enzimatice prin medicamentele methemoglobinizante* Fp = flavoproteide; G—SH şi G—S—S—G = glutation redus şi oxidat; EMP = glicoliza pe calea Embden—Meyerhoff—Parnas; HMP = şuntul hexozomonofosfaţilor (calea Warburg—Dickens—Horecker); G-6-P = glucozo-6-fosfat; G-6-P-DH = glucozo-6-fosfat-dehidrogenaza.

Scanned with OKEN Scanner

albastru de metilen); avînd o viteză de reacţie de aproximativ 10 ori mai mare decît a NADH-methemoglobinreductazei I prezintă o importanţă deosebită în salvarea vieţii persoanelor cu methemoglobinemie tratate cu agenţi reducători. Din sistemul fiziologic de reducere al Met-Hb fac parte şi acidul ascorbic (vitamina C) şi glutationul redus (G—SH); acesta din urmă ar participa direct în reducerea a aproximativ 25% din Met-Hb *(I. Szórády, 1973)*.

Afectarea genetică a structurii şi/sau concentraţiei methemoglobinreductazelor (în special de tip I) are ca rezultat acumularea Met-Hb cu apariţia *methemoglobinemiilor congenitale prin deficit enzimatic*. Studiile genetice pe populaţii şi familii arată că aceasta este o enzimopatie autosomal recesivă, distingîndu-se trei grupe şi anume: *1.* homozigoţii sănătoşi cu activitatea normală a enzimei, *2.* homozigoţi care manifestă simptome clinice şi care pot avea sau nu o activitate enzimatică scăzută şi *3.* purtătorii tarei genetice a enzimopatiei latente, cu activitatea enzimatică scăzută; la aceştia (heterozigoţi), manifestarea simptomelor clinice apare numai ca urmare a medicamentelor sau altor agenţi methemoglobinizanţi. Tendinţa mai mare la methemoglobinemie a noilor născuţi se atribuie unei insuficienţe tranzitorii a methemoglobinreductazei, dar şi altor factori concurenţi, ca de exemplu, producerea deficitară a cofactorilor (NADH etc.), sensibilităţii mai mari a HbF la agenţii oxidanţi decît a HbA, stării de hipovitaminoză C etc. În asemenea cazuri, alături de methemoglobinemie, se înregistrează şi o susceptibilitate mai mare la leziuni ale membranei globulei roşii, însoţită de icter hemolitic marcat.

Un alt tip de methemoglobinemii congenitale se datoresc prezenţei unor *hemoglobine anormale* (patogene), a căror secvenţă de aminoacizi prezintă unele alterări faţă de Hb normale. Astfel, HbM_B, HbM_S, HbM_{M-1} au reactivităţi alterate şi pot produce methemoglobinemii prin două mecanisme: oxidarea mai uşoară a Fe^{2+} la Fe^{3+} sau limitarea (împiedicarea) accesului methemoglobinreductazelor la aceste Hb anormale, cu structuri diferite.

1.3.8.3.8.1. Medicamente methemoglobinizante

O serie de medicamente pot produce, chiar la persoanele normale, o cantitate de Met-Hb care depăşeşte capacitatea reductazelor existente de a menţine Hb în stare redusă. Ele aparţin celor mai variate grupe farmacodinamice.

1. *Antipiretice şi analgezice:* derivaţi de anilină (acetanilida, metilacetanilida, paracetamol), fenazol, chinină
2. *Agenţi antibacterieni:* sulfamide, cloramfenicol, PAS, nitrofurantoina
3. *Agenţi antimalarici:* primachina, mepacrina, pamachina, (chinina)
4. *Antidoţi:* dimercaprol, clorură de metiltioniu (doze mari), tionina
5. *Dermopreparate:* permanganat de K, pirogalol, unguente cu benzocaină
6. *Diverse:* nitriţi (nitroglicerina etc.), nitraţi (nitrat de amoniu etc.), sulfone (diaminodifenilsulfona etc.), cloraţi, bismut, fenilhidrazina, aminofenol, fenilendiamina, toluendiamina, toluhidroxilamina, α-naftilamina, p-aminopropiofenona, fenilhidroxilamina, dinitrobenzenul, tetralina, eozina etc. *[după I. Szórády, 1973]*.

Iniţial aceşti agenţi au fost definiţi ca „toxice sanguine" *(Levin, 1889)* dar, la scurt timp, *(Dittrich, 1892)* s-a făcut o distincţie între toxicele hemolitice *directe*, care formează Met-Hb şi *in vitro* şi în lipsa eritrocitelor (hidroxilamina, nitriţii, cloraţii etc.) şi *indirecte*, care transformă Hb în Met-Hb numai *in vivo*, compuşii nitro- şi aminoaromatici (anilină, nitrobenzen etc.), şi care indică necesitatea proceselor de biotransformare, deoarece efectul se datoreşte *metaboliţilor lor (figura 1.119)*.

S-au emis astfel o serie de ipoteze cu privire la natura metaboliţilor methemoglobinizanţi şi a mecanismului lor de acţiune. Identificarea în urina animalelor şi a persoanelor intoxicate cu *anilină* a p-aminofenolului (capabil să transforme şi *in vitro* Hb în Met-Hb) a condus la prima ipoteză, care incriminează p-aminofenolul şi p-nitrozofenolul în methemoglobinizare; formarea din aceştia a „chinonmonoximei" a îndreptat atenţia asupra mecanismului prin chinone, dar această ipoteză

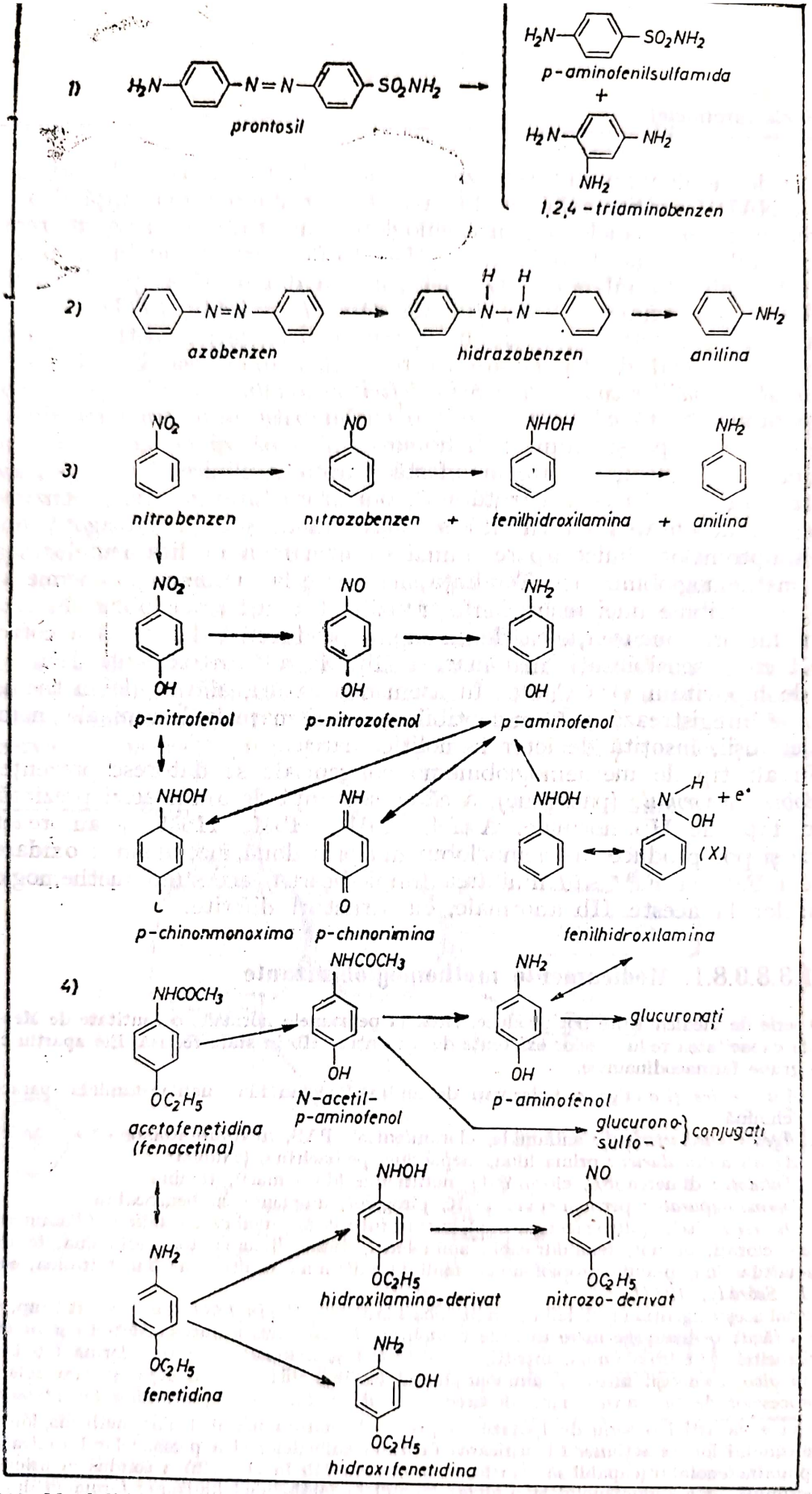


Fig. 1.119. Metaboliți methemoglobinizanți (după D. Bedeleanu, M. Kory, 1976). 1. Scindarea reductivă a prontosilului la sulfamidă activă 2. Azoreducerea azobenzenului 3. Căile de metabolizare prin nitroreducere și hidroxilare aromatică ale nitro-arililor 4. Metabolizarea fenacetinei (p-etoxi-acetanilidă) și a fenetidinei

Scanned with OKEN Scanner

nu poate fi generalizată deoarece anilinele o- şi p-substituite, puternic methemoglobinizante, nu formează chinone. A apărut astfel posibilitatea mecanismului prin N-oxidare, deoarece *fenilhidroxilamina* este unul din cei mai puternici methemoglobinizanţi *in vitro* (formează stoechiometric Met-Hb) iar *in vivo*, în injecţii s.c., are un efect de 10 ori mai puternic decît anilina, formînd pînă la 700 echivalenţi de Met-Hb/molecula administrată. Presupunerea unui mecanism „ciclic", în care fenilhidroxilamina şi nitrozobenzenul ar fi mereu refăcute prin oxidare şi respectiv reducere sau că fenilhidroxilamina „pendulează" între treapta „hidroxilamină" şi un radical ce s-ar forma prin oxidarea sa (compusul X din *figura 1.119)* a fost abandonată datorită observaţiei că ea acţionează asupra soluţiilor de Hb pură numai la o singură adăugare; în schimb, nitrozofenolul ar putea beneficia de un proces „ciclic" în cursul metabolismului celular. O serie de ipoteze se referă la formarea H_2O_2; cantităţile mici de H_2O_2 formate nu produc Met-Hb în eritrocite ea fiind instantaneu desfăcută de peroxidaze şi catalaze; hidroxilaminele, inhibînd aceste enzime (de exemplu fenilhidroxilamina 5×10^{-5}M, respectiv 5 μg/ml inhibă 50% catalaza) face posibil şi acest mecanism, dar, se pare, că pentru eficienţa sa sînt necesare cantităţi mult mai mari de nitrozoderivaţi. Un alt aspect este formarea, alături de Met-Hb a *verdoglobinei*, produs de oxidare al Hb cu deschiderea ciclului porfirinic şi eliminarea unui C de legătură sub formă de CO identificat la om după administrarea sulfamidelor, fenacetinei şi a altor derivaţi de anilină, cu precizarea că transformarea a numai 3% din Hb în verdoglobină produce cianoza la om.

Anilina determină la om, mai ales în intoxicaţii acute, un tablou sever, dar rar mortal; în prezent intoxicaţiile cu anilină sînt aproape exclusiv profesionale, cu etiologii greu de recunoscut. La animale (cîini, pisici), viteza formării Met-Hb scade, comparativ cu anilina, prin N-alchilare (proporţional cu lungimea lanţului alchil) şi prin substituţie dialchilică; se semnalează paralelismul efectului cu formarea nitrozobenzenului şi respectiv a fenilhidroxilaminei. După injectarea i.p. a *m-* sau *p-toluidinei* la pisici se găsesc cantităţi egale de Met-Hb, în timp ce *o-toluidinele*, la doze mici, produc o creştere mai rapidă şi mai intensă a formării Met-Hb. *Tolilhidroxilaminele* au efecte similare fenilhidroxilaminei; *2, 4-dimetilanilina* (xilidina) şi *mezidina* au efecte mai slabe. *Mezitil-hidroxilamina* are de asemenea efecte slabe şi s-a sugerat, în studiile „structură — activitate" că grupele metil învecinate cu N reprezintă un impediment steric, principiu confirmat şi în cazul *N-ciclohexil-N-metil-(2-amino-3,5-dibrombenzen)-clorurii de amoniu* („Bisolvon"), care în doze de 50 mg i.p. la şoarece nu formează Met-Hb. *p-Cloranilina* este cea mai eficientă dintre cloraniline (incriminată ca impuritate methemoglobinizantă din unele preparate farmaceutice). *p-Amino-propiofenona* este considerată ca cel mai puternic methemoglobinizant din grupa arilaminelor (1,25 mg/kg greut. corp. *per os*, la om, transformă 10—20% din totalul Hb în Met-Hb). *4-Amino-distilbenul* (cancerigen) manifestă efecte methemoglobinizante la pisici. Dintre antimalaricele derivate ale 8-aminochinolinei, *plasmochina* ca atare şi unii din metaboliţii săi sînt methemoglobinizanţi, iar *primachina* produce frecvent anemii hemolitice la persoanele cu deficit genetic al G-6-P-DH. *Sulfamidele*, la scurt timp după introducerea lor în terapie au produs methemoglobinemii şi verdoglobinemie, atribuite unor metaboliţi activi, ca de exemplu, hidroxilamino-, nitrozo- şi 3-hidroxisulfamida. Sulfamidele fiind inhibitori ai catalazei s-a sugerat şi o acţiune prin H_2O_2 şi alţi peroxizi. În cazul supradozării sau a sensibilităţii crescute la sulfamide, s-au observat adesea cianoze marcate, fără methemoglobinemie, cauzate de produşii coloraţi de degradare. Apariţia unor leziuni renale şi a hemolizei după *fenacetină* a relevat paralelismul între Met-Hb şi fenetidina din sînge; metabolitul principal pare a fi p-hidroxiaminofenetidina, respectiv nitrozoderivatul ce se formează şi *in vitro* în prezenţa microzomilor hepatici *(figura 1.119)*. Dintre edulcoranţi, *1-alcoxi-2-amino-nitrobenzenul* (0,5—1 g/kg. greut. corp.) produce Met-Hb şi necroze hepatice. Efectul *dinitrobenzenilor* se situează în ordinea $p > m > 0$; dintre *dinitrotoluenii* (DNT), utilizaţi în tehnică, 2,4-DNT are efecte mai puternice decît 2,6-DNT; *4,6-dinitro-1, 3-xilenul* prezintă efecte slabe, iar *2,4-dinitro-1,3,6-trimetilbenzenul* (dinitromeziliten) pare lipsit de acţiunea methemoglobinizantă. *m-Nitrofenil-hidroxilamina* acţionează asupra Hb la fel de rapid ca şi fenilhidroxilamina, dar cu o persistenţă mai lungă în organism. Explozibilul „*TNT*" (2,4,6-trinitrotoluen) în doză de 80 mg/kg greut. corp., i.p. la pisică, manifestă efectul methemoglobinizant maxim în decurs de cinci ore. În legătură cu medicamentele *nitroarilice* se citează cazul unei paciente, care după 5 × 10 mg *nitrofurantoină* (furadantină) a manifestat cianoză, vomă puternică şi pierderea cunoştinţei. Pacienta avea, la două zile după internare o methemoglobinemie de 14%; administrarea, după o perioadă mai lungă de timp, a 300 mg nitrofurantoină ca substanţă „test", a determinat la aceeaşi persoană, o methemoglobinemie puternică (16% Met-Hb), cu maximul la 10 h după administrare.

De un interes cu totul special este comportarea anormală a *nou-născuţilor* şi respectiv a *sugarilor* la agenţii methemoglobinizanţi, fiind cunoscută frecvenţa mai mare a methemoglobinemiei, cianozei şi sensibilitatea lor deosebită. Deşi cauzele acestei comportări nu sînt elucidate în detaliile lor se pot, totuşi, aşa cum s-a menţionat, releva cîteva caracteristici: reducerea aromatică lentă în eritrocite; simpla ingerare a nitraţilor şi nitriţilor, conţinuţi, de exemplu, în apa în care se dizolvă laptele praf, sau contactul cu coloranţii de anilină relevă o mai mare sensibilitate (efect de methemoglobinizare) atribuit proporţiei reduse de grupări -SH din HbF; carenţa relativă a diaforazelor (methemoglo-

Scanned with OKEN Scanner

binreductaze) şi a cofactorilor săi (NADH, NADPH); oxidarea nonenzimatică a NADPH de către fenilhidroxilamină ar putea prejudicia, în continuare, regenerarea Hb din Met-Hb; deficitul de G-6-P--DH, enzima generatoare de NADPH pare a fi implicată ca o cauză principală a acestei sensibilităţi. La sugarii mici (sub 1 lună), după o doză unică de *fenacetină* (15 mg/kg) se produce o cantitate de 4—8% Met-Hb (în decurs de 4 h), în timp ce la sugarii mai mari (4—5 luni), efectul este neglijabil; în schimb, la aceştia, doze zilnice de 15 mg/kg (în supozitoare) produc, din ziua a 3-a, methemoglobinemii de 10%. Asemenea efecte se pot corela cu lipsa capacităţii de glucuronoconjugare şi deci de eliminare a diferitelor medicamente şi a metaboliţilor acestora la sugarii mici şi animalele nounăscute. Spre deosebire de aceste efecte, după administrarea *3-metil-4-dimetilaminoazobenzenului* se constată o cantitate mai mică de Met-Hb la şobolanii de 2 luni faţă de cei de 18 luni; la fel, căţeii formează cu 1/3 mai puţină Met-Hb faţă de cîinii adulţi la doze echivalente de *fenacetină* sau *fenetidină*. Această comportare se poate atribui nivelului scăzut al N-hidroxilării, prima etapă a biotransformării aminelor aromatice în produşi (metaboliţi) toxici *(D. Bedeleanu, K. Kory, 1976)*

1.3.8.3.9. SULFHEMOGLOBINA (SULF-Hb)

În unele cazuri, după administrarea de sulfamide sau fenacetină etc., se constată producerea Sulf-Hb, care poate atinge 10% din Hb totală, cu cianoză marcată, dar fără alte simptome clinice. Structura exactă a Sulf-Hb nu se cunoaşte; se ştie doar că ea conţine mai mult S decît Hb normală.

1.3.8.3.10. CONSIDERAŢII GENETICE ASUPRA HEMOGLOBINELOR

Heterogenitatea hemoglobinelor se întîlneşte la om şi animale şi chiar la o larvă de insecte *(Chronomus thummii)* care posedă 8 variante de Hb *(Braunitzer şi colab.)*.

Studiul comparativ al Hb de la diverse specii sugerează că ele au evoluat dintr-un cromozom primitiv comun, respectiv dintr-o genă ancestrală, prin mutaţii succesive. Argumente pentru această ipoteză sînt numărul aproximativ egal, de 140 aminoacizi, în toate lanţurile; structura secundară şi terţiară similară; legarea hemului, în fiecare lanţ, prin 2 His, separate între ele prin 29 resturi de aminoacizi; identificarea, la o mare varietate de specii (de la insecte la om) a 30 secvenţe de aminoacizi a căror asemănare nu poate fi întîmplătoare; relaţia între numărul de deosebiri în secvenţa aminoacizilor şi ramificarea speciilor în arborele filogenetic. Omologia secvenţei aminoacizilor este cu atît mai mare cu cît speciile sînt mai înrudite filogenetic, de exemplu, lanţurile α şi β ale omului şi gorilei nu diferă decît prin schimbarea unui singur aminoacid pe lanţ; cu toate acestea, omul nu conţine Hb gorilei şi invers. În schimb, lanţurile α din Hb umană diferă de a altor mamifere prin 16—20 înlocuiri de aminoacizi, iar faţă de crap, mai îndepărtat filogenetic, diferenţele sînt de 69 aminoacizi, deci mult mai numeroase *(tabelul 1.45)*.

TABELUL 1.45

Numărul înlocuirilor de aminoacizi în lanţurile α şi β ale hemoglobinelor de la diverse specii, comparativ cu cele umane (după **G. Braunitzer** şi colab.)

Specie:	Cal	Porc	Bovine	Şoarece	Lama	Oaie	Iepure	Crap
Lanţ α uman	(18)	17	17	16	19	20	24	69
Lanţ β uman	24	23	(27)	—	21	A 22 B 23 C 28	14	—

Comparînd lanţurile α şi β umane între ele şi cunoscînd rata de înlocuiri pentru fiecare se poate aprecia perioada cînd „copiile" respective au început să evolueze independent, adică momentul duplicării unei gene ancestrale comune, pe considerentul că deosebirile sînt cu atît mai numeroase cu cît ancestrul com un este mai vechi şi cu atît mai puţine cu cît duplicarea este de dată mai recentă

Momentul separării între lanţurile β — δ ar fi contemporan cu diferenţierea maimuţă-om; β — γ, cu diferenţierea primatelor de alte mamifere; α — β, anterioară diferenţierii peştilor de alte vertebrate iar separarea Mb de Hb în perioada diferenţierii ciclostomilor de alte vertebrate. Acest ultim punct este sugerat de existenţa unui mare grad de deosebiri (70—75% aminoacizi) între Hb peştelui cilindric — singura Hb a vertebratelor cu structură monomeră, similară cu a Mb — şi hemoglobinele tuturor celorlalte vertebrate.

Pentru explicarea asemănărilor şi deosebirilor dintre hemoglobine şi dintre acestea şi mioglobină se susţine că evoluţia a plecat de la o genă care a specificat o moleculă comună denumită *„protoglobina"* din care s-a format iniţial lanţul *m* al Mb (monomer hem-globină); prin mutaţii succesive au derivat lanţurile globinice din Hb, în concordanţă cu observaţia că structura primară a lanţurilor α, β, γ, δ prezintă, fiecare, mai multe asemănări cu lanţul *m* (Mb) decît între ele. În acest sens, Hb monomer de la *lampetra* (peşte ciclostom, de formă cilindrică alungită care poate atinge 1 metru), similară Mb, poate fi considerată ca o adevărată „fosilă moleculară". Evoluţia moleculei monomer spre Hb tetramer este un avantaj: în sensul evoluţiei şi selecţiei darwiniene, căci asigură o eficienţă superioară în transportul O_2, prin efectele cooperative între cele patru lanţuri hem-globină, de două tipuri diferite *(vezi 1.3.8.3.6)*.

Numărul mediu de aminoacizi diferiţi („înlocuiri") între lanţurile α şi β fiind de aproximativ 80; între β şi γ de 39 şi între β şi δ de 10, se consideră că subunitatea cea mai veche este α. Admiţînd că substituirile, prin mutaţii genetice, s-au produs cu un ritm relativ uniform şi considerînd ca primă etapă duplicarea a două lanţuri alcătuite din aproximativ 70 aminoacizi se ajunge la concluzia că lanţul γ s-a diferenţiat de lanţul α înaintea lanţului β, că lanţul ε este mai vechi decît β şi că lanţul δ este cel mai „tînăr" (recent) *(figura 1.120)*.

În acelaşi sens, pledează şi asemănarea mai mare dintre lanţul β al primatelor primitive cu lanţul γ decît cu lanţul β uman„ ceea ce indică separarea mai recentă a vertebratelor (aproximativ 60 milioane de ani); lanţul δ ar fi şi mai recent, deoarece HbA_2, care conţine două astfel de lanţuri, lipseşte de la unele primate *(A. Gajdos, 1972)*.

În privinţa mecanismelor genetice care stau la baza acestor modificări se poate admite că în cursul evoluţiei au intervenit mutaţii simple, care au provocat schimbarea unei singure baze din tripletul codului genetic, similar cu schimbările din hemoglobinele anormale, care nu diferă, de obicei, de lanţurile normale decît prin înlocuirea unui singur aminoacid.

Analiza matematică a secvenţei aminoacizilor din lanţul globinic de la diferite specii sugerează că substituirile aminoacizilor s-au produs prin mutaţii cromozomice „la întîmplare" şi cu ritm regulat. Pentru lanţurile din Hb, o mutaţie evolutivă eficientă a avut loc, în medie, o dată la 7 milioane de ani (= unitatea de perioadă evolutivă, adică timpul necesar pentru producerea unei mutaţii care să determine substituirea unui aminoacid). Se cunosc un număr de 117 locuri schimbate evolutiv (inclusiv Hb monomer de la lampetra) şi se apreciază că şansa de substituiri pentru locul care să schimbă este de 1 la 800 milioane de ani, ceea ce face probabilă şi o evoluţie în continuare *(E. Zuckerkandl, L. Pauling (1965))*.

Compararea secvenţei de aminoacizi din prima, cu a doua jumătate a lanţului Mb, indică un grad de omologie semnificativ mai mare decît ar permite o potrivire întîmplătoare. Se poate astfel presupune că gena mioglobinei a provenit prin duplicarea, cu sudarea „cap la coadă" a unei gene originare ce codifică polipeptida cu aproximativ 70 aminoacizi. La un moment dat al evoluţiei, această genă dublată s-a duplicat şi una din copii a dus în linie directă la Mb actuală, iar cealaltă, printr-un proces de translocare, s-a îndepărtat în cromozom de locul pe care îl ocupa iniţial. Ulterior ea a dat naştere, prin duplicare, la două noi gene: una care a evoluat spre cea pentru lanţul α actual şi cealaltă a suferit un proces de translocare similar precedentului. Prin duplicarea acesteia din urmă au apărut alte două gene, una care a condus la gena lanţului γ actual, cealaltă urmînd procesul de translocare. Ultimele două gene apărute (prin duplicarea precedentei) sînt cele care au evoluat spre genele pentru lanţurile β şi δ actuale, încă învecinate (netranslocate). Descoperirea lanţurilor ε a dus la completarea schemei prin intercalarea unei trepte în plus între gena lanţurilor α şi cea care a dat apoi naştere genelor pentru lanţurile γ, β şi δ *(figura 1.120)*. O schemă, poate mai apropiată de realitate *(figura 1.121)* ilustrează evoluţia acestor gene printr-o linie continuă între gena Mb ancestrală şi aceea a lanţurilor δ umane actuale, din care s-au desprins (şi translocat) genele celorlalte lanţuri.

Procesul de duplicare este de fapt cu mult mai pronunţat deoarece există trei gene pentru lanţurile β umane, din care două gene codifică exact aceeaşi secvenţă de aminoacizi, iar cea de a treia, o secvenţă modificată numai într-un loc; la fel, s-au descris mai multe gene nealele pentru lanţurile α de cal şi capră şi pentru β de oaie. După acestă ipoteză ar fi de aşteptat ca pe scara evolutivă să se găsească la diversele specii un număr diferit de gene pentru globine; de fapt, la unul din cele mai primitive vertebrate, *Lampetra fluviatilis* (menţionată anterior) s-au găsit patru tipuri de globine (două embrionare şi două la adult) care nu se asociază însă în tetrameri (decît foarte slab în stare deoxigenată). Deosebirile între secvenţele de aminoacizi ale acestora şi lanţurile globinelor de la mamifere

Scanned with OKEN Scanner

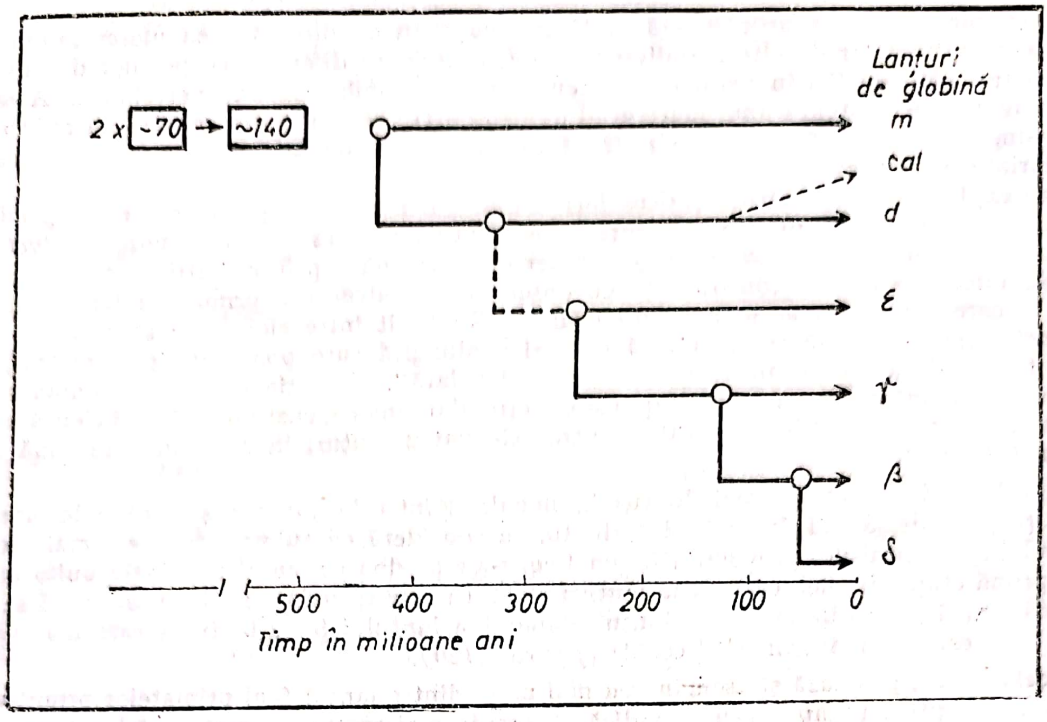


Fig. 1.120. Schema diferențierii în evoluție a lanțurilor de globină

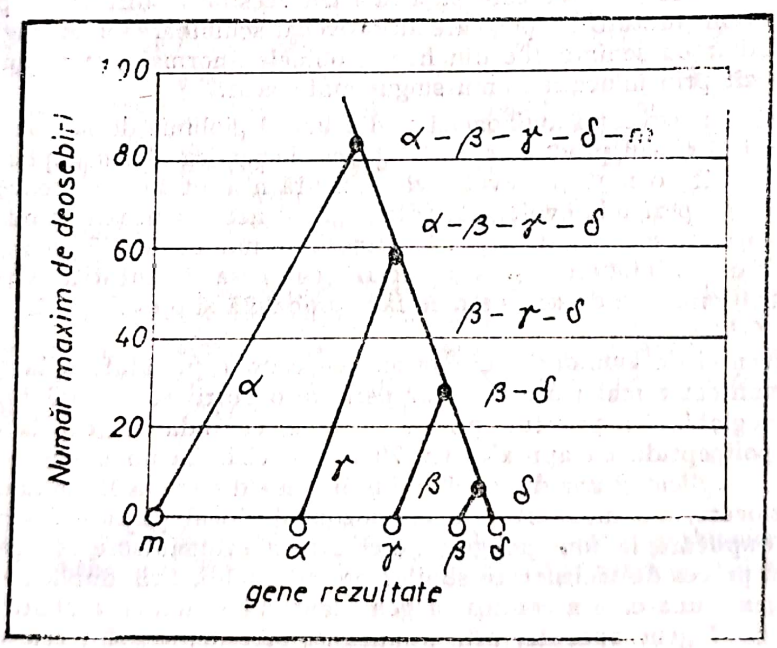


Fig. 1.121. Schema evoluției genelor pentru lanțurile de globine (după E. Zuckerkandl, L. Pauling, 1965)

se apropie de numărul diferențelor față de Mb de balenă, indicînd că ancestorul comun pentru lanțurile globinelor de la mamifere și Lampetra a apărut în timp, cu foarte puțin după duplicarea genei inițiale a mioglobinei *(tabelul 1.46)*.

Mutațiile suferite de genele duplicate ale diverselor globine au condus final la diversitatea actuală a secvențelor de globine. Compararea acestora arată că mutațiile reținute (fixate) nu alterează un anumit tip de structură, implicată în asigurarea omologiei arhitecturii tridimensionale. Într-adevăr, în toate globinele cunoscute sînt păstrate cîteva resturi de aminoacizi strict invariabile, în aceeași poziție și care se poate presupune că sînt absolut necesare configurației tridimensionale ce asigură

TABELUL 1.46

Numărul resturilor de aminoacizi prin care diferă lanţurile globinelor (după C. Nolan şi E. Margoliash)

Lanţuri comparate	*Nr. de schimbări*
1. *TOATE GLOBINELE*	
Mioglobina de balenă — toate globinele	114—125
Hemoglobina Lampetra — toate celelalte globine	107—118
Lanţuri α — lanţuri non α	76—95
Lanţ α de crap — lanţ α mamifere	54—62
Lanţ γ uman — toate celelalte lanţuri non α	36—48
Lanţ δ uman — lanţ β uman	10
Lanţuri α cu α între ele	0—62
Lanţuri non α cu non α între ele	0—49
2. *GLOBINELE DIN HEMOGLOBINELE DE LA MAMIFERE*	
Lanţuri α cu lanţuri α între ele	0—28
Lanţuri α de la primate între ele	0—26
Lanţuri α umane cu lanţuri α de la maimuţele inferioare	15—24
Lanţuri α de la primate — lanţuri non α	16—28
Lanţuri β cu lanţuri β între ele	0—48
Lanţuri β de la primate între ele	0—41
Lanţ β uman cu lanţurile β de la maimuţele inferioare	29—31
Lanţuri β de la primate — cu lanţuri β de la alte animale	24—48

activitatea fundamentală de legare reversibilă a oxigenului la Mb şi Hb. Acestea sînt Phe CD 1; His E 7; Leu F 7; His F 8; Liz H 10 şi Tir H 23; înlocuirea unora din aceşti aminoacizi cu alţii conduce la Hb anormale.

Urmărind modul în care au fost înlocuiţi aminoacizii din diversele secvenţe, se observă respectarea anumitor reguli. Astfel, din 33 resturi orientate spre interiorul plierii lanţului, cel puţin 27 sînt apolare în toate globinele; restul de 6 pot fi înlocuite cu resturi polare; din 115—116 resturi comparabile de la suprafaţa fiecărui lanţ, 9 sînt ocupate învariabil de resturi apolare ((de exemplu Pro, cu rol în întreruperea α-helixurilor); alte 22 locuri sînt ocupate de resturi polare (unele implicate în contactul cu hemul sau în legăturile dintre lanţuri în tetrameri). Trebuie precizat că este importantă nu numai poziţia înlocuirii ci şi natura aminoacidului care se substituie, în raport de aminoacidul înlocuit. Astfel, Gli E 8 poate fi înlocuit cu Ala, fără modificarea proprietăţilor, datorită asemănării între cei doi aminoacizi, mecanism denumit „schimb echivalent de aminoacizi". Ca regiuni relativ invariabile se consideră cele dintre F 4 — G 12; B 6 — CD 7 şi E 2 — E 8. Înlocuirea aminoacizilor care realizează punţile de contact, de exemplu Arg FG 4, 92 (comună tuturor lanţurilor cunoscute şi care stabileşte legăturile între subunităţile ($\alpha_1\beta_2$), conduce la Hb umane cu proprietăţi alterate, iar lipsa sa face să nu mai apară tetramerii (Mb, Hb din Lampetra etc.) (*după I. Manta, Gh. Jebeleanu*, 1971).

1.3.8.3.10.1. Hemoglobine anormale

Se cunosc peste 150 de *hemoglobine anormale* determinate de diferite mutaţii genetice şi care apar, aproape fără excepţie, în cadrul anumitor familii. Unele dintre acestea nu au consecinţe, dar altele sînt suficient de pernicioase pentru a manifesta, la heterozigoţi, simptome clinice mai mult sau mai puţin grave *(C. Perutz, 1974)*. În general, este vorba de mutaţii *punctuale* cu modificarea unui singur aminoacid; notarea se face printr-o săgeată îndreptată de la aminoacidul înlocuit spre cel cu care s-a făcut substituirea (anormal).

Dintre criteriile de clasificare menţionăm unul care se referă la genele supuse mutaţiilor şi altul, la nivelul din molecula Hb unde apare aminoacidul anormal.

Scanned with OKEN Scanner

După prima clasificare se consideră

A. Mutații ale genelor structurale, cu *1.* variante anormale ale Hb A majoră (*a.* mutații ale extremității N-terminale ale lanțurilor β; b. Hb instabile; *c.* mutații methenoglobinizante sau cianozante); *2.* variante anormale ale HbA minore și *3.* variante anormale ale Hb fetale și embrionare

B. Mutații ale genelor reglatoare, cu *1.* Hb tetramere omoloage (*a.* formate din tetrameri α și *b.* din tetrameri non-α), *2.* tulburări eterogene de aranjament molecular (de exemplu în talasemii) și *3.* Hb cu lanțuri hibride *(după Al. Vîlcu, 1977)*.

După o a doua clasificare:

Mutații care afectează fixarea hemului

1. Mutațiile His E 7 și F 8, de exemplu, HbM (His → Tir); restul de Tir, mai voluminos ca al His, formează o a 6-a legătură coordinativă a Fe heminic, care stabilizează forma Fe^{3+} (Met-Hb) și împiedică total fixarea reversibilă a O_2; asemenea HbM pot fixa O_2 pe lanțurile lor normale, dar nu mai apare efectul cooperativ și molecula păstrează conformația „redusă" chiar dacă fixează O_2. Hb Zürich: βE 7 His → Arg, cu eliminarea His distale din ambele lanțuri β, se comportă practic normal, dar prezintă o tendință crescută de transformare în Met-Hb sub influența unor medicamente (sulfamide), cu apariția anemiei hemolitice *(vezi 1.3.8.3.8)*.

2. Mutații ale ambianței nonpolare a hemului, de exemplu, Hb Hammerschmith: βCD 1 Phe → Ser, în care înlocuirea unuia din cei 8 aminoacizi hidrofobi invariabili, cu un acid polar, conduce la o Hb denaturabilă prin căldură și care își pierde ușor hemul; clinic se observă anemie hemolitică cu corpusculi Heinz. Hb Gunn Hill, cu deleția regiunii β F 7—FG 4, ce cuprinde și His proximală, este instabilă și nu mai fixează hemul pe lanțurile sale β. Hb Sidney: β E 11 Val → Ala, Hb Santa Ana: βF 4 Leu → Pro și Hb Köln: β FG 5 Val → → Met, au toate o instabilitate crescută și produc anemii hemolitice cu corpusculi Heinz. HbM Milwaukee: βE 11 Val → Glu, favorizează producerea Met-Hb stabile, prin formarea unor legături ionice între —COOH din Glu și fierul heminei.

Mutații care afectează contactele dintre subunități

În cazul afectării contactelor $\alpha_1\beta_1$, efectele sînt de mai mică importanță, cu excepția celor care suprimă 2 din cele 4 punți de H dintre aceste subunități și care duc la Hb ce se denaturează ușor prin încălzire. În schimb, mutațiile în vecinătatea contactelor $\alpha_1\beta_2$ au consecințe importante, ca de exemplu, afinitatea crescută pentru O_2 cu scăderea efectului cooperativ, dar fără modificarea efectului Bohr, ca în cazul Hb J. Capetown: αFG 4 Arg → Glu-NH_2; Hb Chesapeake: α FG 4 Arg → Leu; Hb Yakima: β G 1 Asp → His și Hb Kempsey: β G 1 Asp → Asp-NH_2. Clinic apare o policitemie, datorită faptului că hematiile nu eliberează O_2 decît la o presiune parțială foarte scăzută. În Hb Kansas: β G 4 Asp-NH_2 → Thr, dispare puntea principală de H din contactele $\alpha_1\beta_2$ ale HbO_2, cu diminuarea stabilității termice, a afinității pentru O_2 și parțial a efectului cooperativ, conducînd la cianoze.

Mutații care afectează interiorul lanțurilor

În Hb Wien: β H 8 Tir → Asp, înlocuirea unui aminoacid aromatic cu unul foarte polar în zona hidrofobă dintre helixul A și H duce la suprimarea acestei regiuni cu formarea unor molecule foarte instabile ce determină anemii hemolitice cu corpusculi Heinz.

Scanned with OKEN Scanner

Mutații ale aminoacizilor din exteriorul moleculei

Se cunosc peste 60 de asemenea anomalii, care, în majoritatea cazurilor nu produc decît o modificare a vitezei de migrare electroforetică, fără alte consecințe, confirmînd astfel importanța mai redusă a exteriorului moleculei Hb pentru funcțiile sale. Hb Porto Alegre: β A 6 Ser → Cis prezintă punți disulfurice suplimentare intermoleculare. În Hb Hiroshima: β H 21 His → Asp, înlocuirea acestui aminoacid de la marginea cavității interioare din locul de fixare al DPG, determină o afinitate crescută pentru O_2, fără modificarea semnificativă a efectului cooperativ, dar cu un efect Bohr foarte scăzut, modificări traduse clinic prin poliglobulie.

HbS rezultă din mutația β A 3 Glu → Val; apariția unui rest hidrofob la periferia moleculei, face ca restul N-terminal al lanțului β, de asemenea hidrofob (Val), să se deplaseze și să intre în contact cu noul aminoacid și ca gruparea sa $-NH_2$ să se lege de o grupare acidă ce aparține unui lanț α al altei molecule de Hb; se explică astfel ușurința cu care HbS cristalizează în forme „tactoide" sau filamente, foarte puțin solubile (Murayama). Acest fenomen se produce numai în forma „deoxi", deoarece în forma HbO_2, mai compactă, extremitatea N-terminală este normal fixată la extremitatea C-terminală a altui lanț β. Datorită acestui mecanism, HbS se caracterizează prin tendința de a cristaliza în ace lungi insolubile, în cursul deoxigenării, ceea ce are ca rezultat deformarea hematiilor care primesc aspectul celulelor „falciforme" (în formă de „seceră"). Clinic, sub influența desaturării în oxigen, apar cîteva celule falciforme, care cresc vîscozitatea sîngelui și obstruează capilarele și determină o anoxie locală, care, favorizează, în continuare, reducerea Hb, crescînd astfel și mai mult formarea hematiilor falciforme. Rezultatul acestui „cerc vicios" este producerea unui infarct în regiunile interesate și explică astfel caracterul paroxistic al acestor fenomene. În plus, deformarea hematiilor poate provoca o liză celulară, fie direct, fie prin fagocitoză ulterioară, de unde anemia hemolitică.

Această tară, drepanocitară, este cea mai frecventă dintre Hb anormale, atingînd chiar 40% din populațiile din unele regiuni ale Africii. Deoarece ea oferă o rezistență mai mare heterozigoților față de paludism se consideră că „tara drepanocitară" constituie o mutație selectiv avantajoasă pentru aceste populații *(E. Vadot, 1968)*.

1.3.8.4. *CITOCROMII*

Citocromii au fost descriși inițial ca „pigmenți tisulari similari celor din sînge" *(Mac Munn, 1886)* și apoi „redescoperiți" și denumiți *„citocromi" (Keilin, 1925)*, pe baza caracteristicilor lor spectrale; ulterior s-a reușit izolarea și purificarea lor *(Keilin, Hartree)*, stabilirea structurii și secvenței de aminoacizi *(Tuppy)*, precizarea rolului lor enzimatic *(O. Warburg)* și în lanțul respirator *(Keilin, Chance)*.

În prezent se consideră că grupa citocromilor constituie componente importante a tuturor organismelor, cuprinzînd toate **hemoproteidele intracelulare** („hemine celulare"; „hemincoenzime"), legate de particulele subcelulare (mitocondrii, microzomi), cu rol de catalizatori redox, respectiv de „substrate ajutătoare" în lanțul respirator, în conservarea energiei, fotosinteză, în diferitele oxidări ale substratelor endogene și exogene și în procesele metabolice ale unor

bacterii anaerobe. Citocromii aparţin celor mai vechi proteine, care nu au suferit decît modificări nesemnificative — prin mutaţii punctiforme — în ultimele două miliarde de ani, impunîndu-se astfel ca „instrumente" ideale pentru studiile asupra mecanismelor moleculare implicate în evoluţia filogenetică.

Partea prostetică a citocromilor este reprezentată prin diferite fier-porfirine. Rolul transportor al e^- se manifestă prin schimbarea valenţei fierului: $Fe^{2+} \underset{+e^-}{\overset{-e^-}{\rightleftharpoons}} Fe^{3+}$ şi, respectiv, în schimbul de H: $R—Fe^{2+}: OH_2 \xrightarrow{-H^+} R—Fe^{3+}: OH^-$. Urmărirea stării de valenţă a fierului se face prin „toxicele celulare" şi anume, inhibarea Fe^{3+} cu CN^{1-} ($10^{-4}—10^{-3}$M) şi a Fe^{2+} prin CO; complecşii Fe—CO sînt sensibili la lumină *(Haldane)*. Concomitent cu schimbarea valenţei fierului au loc şi modificări spectrale, care sînt mai pregnante în forma redusă (Fe^{2+}) decît în cea oxidată (Fe^{3+}) *(figura 1.123)*, de exemplu, cit. c. din muşchiul cardiac al mamiferelor are o culoare roşie-portocalie în forma oxidată şi roşie-violetă în forma redusă.

Clasificarea citocromilor se face după structura părţii prostetice (substituirile la ciclul porfirinic) şi modul de legare cu apoproteina *(figura 1.122)*, după spectrele de absorbţie, în special benzile α, β, γ *(figura 1.123)* şi după potenţialul redox (potenţial de electrodă) *(tabelul 1.47)*.

TABELUL 1.47

Citocromii: caracteristici structurale şi funcţionale (I); maximele de absorbţie spectrală (II) şi dependenţa de pH a spectrelor de absorbţie ale citocromului c

I. *Caracteristici structurale şi funcţionale ale citocromilor*

Cit.	Gr. mol.	Potenţial redox (V)	Redus de:	Oxidat de:	Grupări funcţionale
a	240.000	+0,28	cit. c	cit. a_3	Hem a (citohem) „verde" similar cu hemul din Spirographis
a_3		+0,30	a, c	oxigen	Idem
b	30.000	+0,05	Coenz. Q	c_1	Protohem = Fe-protoporfirină IX
c	13.000	+0,26	c_1	$a—a_3$	Hem c, cu legături covalente (tioeter) prin resturile vinil (hidratare) ale porfirinei cu grupările (—SH ale apoproteinei)
c_1	370.000	+0,23	b	c	Idem

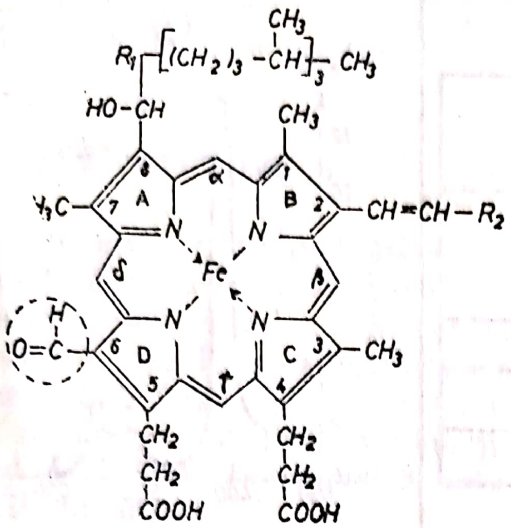
II. *Maximele de absorbţie spectrală (în nm)*

Citocromi	α	β	γ
a (redus)	600		449, 439
a_1 (Azobacter)	589		
a_2 (microorganisme)	628		
a_3	603		443
b	567 (563)	520 (532)	432 (429)
c (redus)	550	521	417, 345, 316
c (oxidat)	565	530	470, 346
c_1	554	524	418

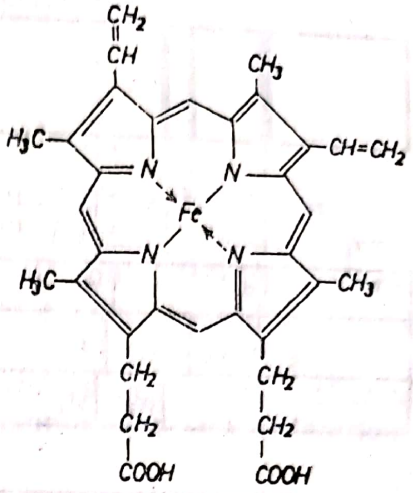
III. *Spectrele citocromului c în dependenţă pe pH*

Tip	pH	pK	Maximele de absorbţie (nm)
I	0,5	0,42	635, (580), 530, 510
II (şi I, III)	1,5	0,42	622, 525, 497, 395, 275
III	4—8	2,50	695, (655), (565), 530, 408, 365, 280
IV	11—11,5	9,35	565, 537, 408, 355, 280
V	14	12,76	565, 536, 412, 350, 290

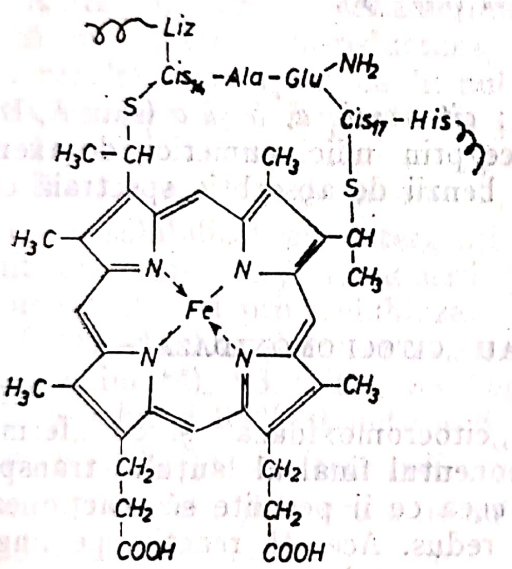
Scanned with OKEN Scanner



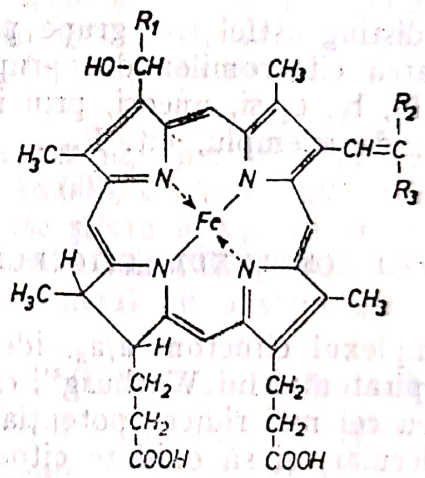
Citocromii A
(cu Fe-formilporfirină)



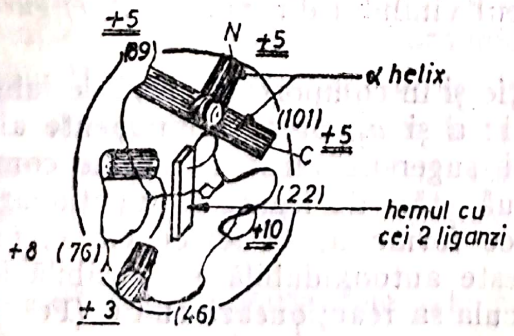
Citocromii B
(cu Fe-protoporfirina IX)



Citocromii C
(cu Fe mezoporfirina substituită, legată covalent cu proteină)



Citocromii D
(cu Fe-dihidroporfirină)



Comportarea lanțurilor peptidice ale citocromului C a vertebratelor (104 resturi) cu 2 citocromi C bacterieni: C_2 (112 resturi) și C_{550} (137 resturi)

Cifrele în paranteză: resturile de aminoacizi în citocromul C de cal

Cifrele cu +: locurile de inserție în citocromul C_2 (subliniate cu o linie) și în citocromul C_{550} (două linii)

Fig. 1.122. Clasificarea citocromilor pe baza structurii părții prostetice (sus) și compararea lanțurilor peptidice ale citocromului c a vertebratelor și de la bacterii (jos).

Scanned with OKEN Scanner

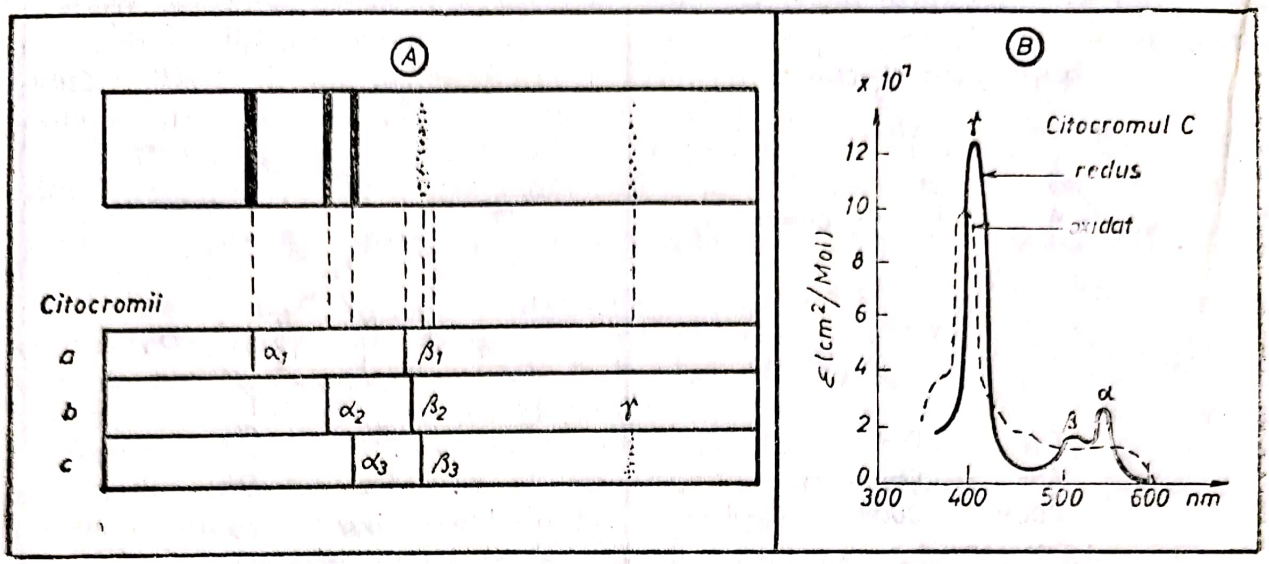


Fig. 1.123. Benzile de absorbţie ale citocromilor „in vivo" (A) şi spectrele de absorbţie ale citocromului c redus şi oxidat „in vitro" (B).

Se disting astfel trei grupe principale: *citocromii a, b şi c* (sau A, B, C); desemnarea citocromilor din grupe se face prin indici numerici, de exemplu, cit. a_3, b_1, b_5, c_1 şi, uneori, prin indicarea benzii de absorbţie spectrală caracteristică, de exemplu, cit. P_{450}.

1.3.8.4.1. COMPLEXUL „CITOCROM a/a_3" SAU „CITOCROMOXIDAZA"

Complexul citocrom a/a_3, identic cu „citocromoxidaza" şi cu „fermentul roşu respirator al lui Warburg", este componentul final al lanţului transportor de e^-, cu cel mai ridicat potenţial redox, ceea ce îi permite să reacţioneze cu O_2 (molecular) şi să oxideze citocromul c redus. Această reacţie, pe lîngă Fe heminic, necesită şi *cupru*, strîns legat de apoproteină.

Partea prostetică, *citohemina* (Warburg, Lynen) prezintă asemănări cu hemul, dar diferă de acesta prin înlocuirea $-CH_3$ din poziţia 8 cu —CHO şi prin ataşarea unui lanţ cu 17 atomi de C în locul vinilului din poziţia 2 *(figura 1.122)*.

Pe baza diferenţelor în spectrele de absorbţie şi în comportarea faţă de inhibitori s-a considerat existenţa a doi citocromi: a şi a_3, părţi componente ale unei hemoproteide unice; cercetările mai noi sugerează însă că aceste componente nu sînt doi citocromi diferiţi, ci două stări de legare şi funcţionare diferită ale aceleiaşi hemoproteide; în timp ce forma a, la fel cu cit. c, nu reacţionează cu O_2, CO şi CN^{1-}, forma a_3 este autooxidabilă şi sensibilă la „toxicele respiratorii", deoarece fierul din molecula sa reacţionează cu CO (Fe^{2+}), respectiv cu CN^{1-} (Fe^{3+}).

Citocromul izolat şi purificat din muşchiul cardiac apare ca o lipohemproteidă cu 4 grupări hem şi 4 cromofori cu cupru pe molecula ce conţine lipide (gr. mol. 440.000) şi respectiv lipsită de lipide (gr. mol. 350.000). Prin tratare cu guanidină-HCl (1 M) sau dodecilsulfat de Na (0,5%) are loc depolimeri-

zarea la forma de dimer (gr. mol. 190.000) care are o activitate 2—3 ori mai mare decît a tetramerului; monomerii, obținuți din dimeri prin creșterea pH-ului, sînt, la fel cu tetramerii, mai puțin activi.

1.3.8.4.2. CITOCROMII b

Citocromul b, prezent în *mitocondrii*, are o parte prostetică, Fe-protoporfirină IX, similară cu cea din Mb și Hb *(fig. 1.98, 1.99 și 1.122)*. Apare strîns legat de membranele mitocondriale, sub formă de dimer (gr. mol. 60.000); fiecare monomer conține cîte 1 atom de fier central, care este nonautooxidabil și nu reacționează cu CO sau CN^{1-}. Pe baza potențialului redox scăzut se situează, în lanțul respirator, între ubichinonă și cit. c și participă astfel în oxidarea succinatului și NADH; *citocromul* b_2 este parte componentă a lacticodehidrogenazei (LDH) din drojdie.

Citocromul b_5 este caracteristic pentru *microzomi*; în lanțul transportor de e^- din reticulul endoplasmic neted (din care se obțin microzomii) se situează între NADH și O_2 și își exercită acțiunea catalitică printr-o activitate de schimb specifică cu citocrom b_5-reductaza (oxidaza) sau cit. c. Necesitatea pentru aceștia rezultă din faptul că hemul este puternic atașat de apoproteină prin legătura covalentă ce implică His și astfel nu poate reacționa direct cu O_2; din același motiv, molecula cit. b_5 este protejată și față de atacul enzimelor proteolitice, a acizilor și ureei.

Cit. b_5 solubilizat cu detergenți apare ca un oligomer (gr. mol. 120.000), alcătuit din mai mulți monomeri (gr. mol. 16.000, cu cîte 126 aminoacizi). Monomerii obținuți prin solubilizare cu proteaze și/sau lipaze au gr. mol. mai mici (10.000—11.000) și un număr mai mic de aminoacizi: 82 (porc), 83 (găină), 87 (om, maimuță), 93 (vite), 98 (iepure); în general au o structură terțiară 50% în α-helix și 25% structură β.

Cit. b_{562} din *Escherichia coli*, cu gr. mol. 12.000, alcătuit din 110 aminoacizi, cu o secvență și legare a hemului similare Mb, are cel mai ridicat potențial redox din grupul cit. b (cu excepția oligomerului cit. b_6 și cit. b_{559} din granulele cloroplastelor plantelor superioare).

Alți cit. b-oligomeri sînt *cit.* b_1*-tetramer* din *E. coli*, cu activitate de piruvatdehidrogenază (gr. mol. 265.000; monomerii: 64.000) și *cit.* b_2 din drojdie, complex flavohemin-L-lactatdehidrogenază, disociabil în subunități prin guanidin-HCl și dodecilsulfat-Na.

Din grupul citocromilor b face parte și *citocromul* P_{450}, numit astfel după maximul de absorbție al derivaților cu CO la 450 nm. Oligomerul (cu gr. mol. 850.000) este alcătuit din 16 subunități identice (gr. mol. 53.000) cu S grupe hem.

Cit. P_{450} și variantele sale prezintă o deosebită importanță ca părți componente ale „oxidazelor cu funcțiuni mixte microzomiale", notate în limba română cu „OFMM" (D. *Bedeleanu*, 1976), care participă în metabolizarea colesterolului și a altor compuși endogeni și în biotransformarea medicamentelor și a altor substanțe străine (xenobiotice). *(D. Bedeleanu, M. Kory, 1976).*

Scanned with OKEN Scanner

1.3.8.4.3. CITOCROMII c

Cit. c este componentul principal al lanțului respirator din mitocondriile tuturor eucariotelor. Datorită cantității mari, în special din mușchiul cardiac și din mușchii implicați în zborul păsărilor, ușurinței de extragere și izolare (se deosebește de ceilalți citocromi prin solubilizarea mai ușoară din structurile mitocondriale și prin stabilitatea mai mare la acizi, alcalii, căldură) și greutății moleculare relativ mici — la vertebrate 12.400 cu 104 aminoacizi, la plantele superioare, 13.000, cu 111 aminoacizi — este una dintre proteinele cele mai intens studiate.

Cit. c izolat are o activitate mai slabă decît în stare nativă, ceea ce sugerează rolul important al integrării sale în complexul lipoproteic al membranelor mitocondriale. Agregatele de cit c. (adesea artefacte), spre deosebire de formele normale, sînt autooxidabile și inactive biologic; prin adăugarea ureei sau guanidinei-HCl ele se dezagregă și se reactivează.

Molecula cit. c are o formă aproape sferică ($Ø = 30$ Å); caracteristic pentru structura primară *(figura 7.122)* este legarea părții prostetice de apoproteină prin două legături covalente stabile de tip tioeter ce se stabilesc între grupările vinil ale Fe-protoporfirinei IX și grupele —SH ale Cis 14 și 17 din lanțul proteic. Ionul de Fe central este hexacoordinat: patru legături se stabilesc cu N din nucleii pirolici; una cu grupa —S— din Met 80 și una cu ε —N al His 18; δ—N al His 18 formează o legătură de H cu gruparea —CO— din poziția 30 a lanțului peptidic. Un rest propionic al hemului este îndreptat către suprafața moleculei; celălalt spre interior unde este implicat într-o rețea de legături de H cu O carboxilici, stabilindu-se astfel legături cu OH al Tir 48 și cu NH din indolul Trp 59. Resturile implicate în aceste legături și alte resturi laterale situate în jurul hemului sînt esențiale pentru structură și funcție și de aceea respectivii aminoacizi apar invariabili în toate tipurile de citocromi c. Ansamblul acestor legături oferă o conformație specială, cu „cuibărirea" rigidă a hemului în lanțul polipeptidic care îmbracă strîns gruparea hem, lăsînd doar una din laturile acesteia neacoperită. În consecință, Fe din cit. c nu reacționează cu O_2 (nu este autooxidabil); în lanțul respirator este, pe de o parte, redus de citocrom-c-reductază (flavoproteidă) și, pe de alta, oxidat de către citocromoxidază, în reacție cu O_2; de asemenea, cit. c nu este sensibil la „toxicele respiratorii" (CO, CN^{1-}).

Citocromii c din plantele superioare și de la vertebrate nu au în capătul N-terminal gruparea $-NH_2$ liberă, ci aminoacizi acetilați (N—Ac—Ala; N—Ac—Gli), în timp ce la nevertebrate, în locul acestor grupe acetil apare un lanț oligopeptidic, cu maximum 7 aminoacizi.

Liz 27, 79, 87, 100 și Arg 38 și 91 conferă citocromilor c un caracter bazic ($pH_i = 10$), iar Liz 72 și 73 participă în reacția cu citocromoxidaza.

Din compararea secvenței a peste 50 citocromi c de la diferite specii rezultă că structura lor primară prezintă o mare similitudine, nu numai în clasa vertebratelor, ci și între specii îndepărtate filogenetic, ca de exemplu, cal și *Rhodospirillium* (bacterie fotoanaerobă) care are cit. c_2; dintre cele 104 resturi ale aminoacizilor citocromului c cardiac și respectiv 112 ale cit. c_2 (gr. mol. 13.500; $pH_i = 6{,}3$), un număr de 43 aminoacizi sînt identici.

Compararea structurii tuturor citocromilor c cu secvența cunoscută relevă 35 resturi invariabile (23%), repartizate în special în două regiuni cu o secvență mai constantă: 17—32 și 67—80 *(figura 7.124)*.

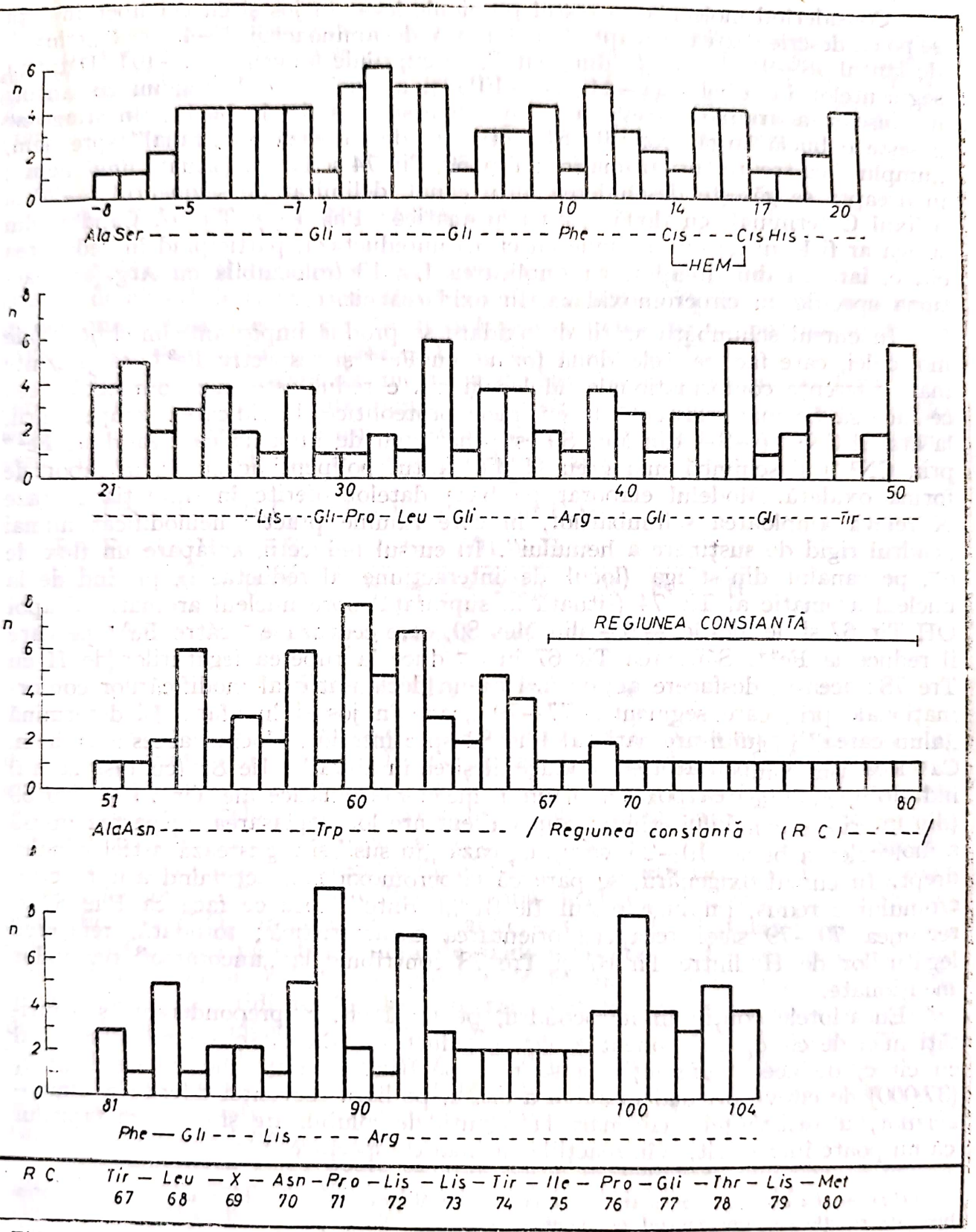


Fig. 1.124. Structura primară a citocromului c de la 40 de specii : 13 mamifere, 5 păsări, 2 reptile, 1 broască, 5 pești, 1 melc, 4 insecte, 5 plante superioare, 4 ciuperci. În figură se indică simbolul aminoacizilor care nu s-au modificat prin evoluție: 35 la citocromii cu 104 resturi de aminoacizi și, respectiv, 37 la cei cu 107—112 aminoacizi. Numărul resturilor variabile, *n*, rezultă din diagramă. *(după H. D. Jakubke și H. Jesschkeit, 1976)*

Scanned with OKEN Scanner

Considerînd molecula cu restul propionic legat în jos şi cu cel liber în faţă se poate descrie partea „dreaptă", delimitată de aminoacizii 1—47, cea „stîngă" de lanţul 48—91 şi partea „din spate", ce cuprinde secvenţa 92—104. Datorită segmentelor în α-helix (1—11; 89—101) şi a unei serii de regiuni cu lanţuri destinse şi a aranjării acestora în spaţiu apar o serie de bucle; în stînga se găseşte o buclă largă (poziţiile 51—74) care delimitează un „canal" spre hem, „umplut" cu trei resturi aromatice: Trp 59, Tir 74 şi Tir 67 (situată lîngă hem); în dreapta se găseşte deschiderea altui canal, delimitat de segmentul 6—20 şi helixul C terminal, cu două resturi aromatice: Phe 10 şi Tir 97. Canalul din stînga ar fi locul de interacţiune cu citocromreductaza, participînd în reducerea cit. c, iar cea din dreapta, cu implicarea Liz 13 (înlocuibilă cu Arg) ar reacţiona specific cu citocromoxidaza, în oxidarea cit. c.

În cursul schimbării stării de oxidare se produc importante modificări ale moleculei, care fac ca cele două forme, cu Fe^{2+} şi respectiv Fe^{3+}, să prezinte mari diferenţe conformaţionale. Molecula cit. c redus este mai compactă, ceea ce face să fie mai rezistentă la enzimele proteolitice, la ridicarea temperaturii, la atacul CN^{1-} (—S— din Met 80 este mai greu de înlocuit ca ligand al Fe^{2+} prin CN^{1-}) şi schimbă mai greu H din lanţul polipeptidic cu D, în raport de forma oxidată. Modelul elaborat pe baza datelor oferite în difracţia cu raze X relevă amploarea schimbărilor, în care rămîne practic nemodificat numai „cadrul rigid de susţinere a hemului". În cursul reducerii, ar apare un flux de e^-, pe canalul din stînga (locul de interacţiune al reductazei), plecînd de la nucleul aromatic al Tir 74 (situată la suprafaţă) spre nucleul aromatic şi apoi OH Tir 67 şi de aici la —S— din Met 80, care cedează e^- către Fe^{3+} pe care îl reduce la Fe^{2+}. Sărăcirea Tir 67 în e^- duce la ruperea legăturilor de H cu Tre 78; această desfacere acţionează ca un declanşator al modificărilor conformaţionale prin care segmentul 77—79 „cade în jos şi în afară" şi determină „alunecarea" inelului aromatic al Phe 82 spre interior, blocînd accesul la hem. Ca mecanism compensator se produce „ieşirea în afară" a Ile 81 (cu rest lateral hidrofob), modificarea poziţiei planului inelelor aromatice ale Tir 74 şi Trp 59 (din interiorul canalului stîng); concomitent are loc deplasarea, în partea opusă a moleculei, a buclei 19—25, care migrează „în sus" şi îngustează astfel canalul drept. În cursul oxigenării, se pare că citocromoxidaza, acţionînd asupra citocromului c redus, împinge restul Ile 81 „înainte", ceea ce face ca Phe 82 şi regiunea 70—79 să-şi recapete orientarea caracteristică; totodată, refacerea legăturilor de H dintre Tir 67 şi Tre 78 contribuie la „ancorarea" regiunilor menţionate.

Eucariotele conţin în mitocondrii, pe lîngă cit. c (preponderent) şi cantităţi mici de cit c_1, component al cit. c-reductazei. Cit c_1 se aseamănă spectral cu cit c, de aceea diferenţierea se face pe baza greutăţii moleculare a cit c_1 (37.000) de cîteva ori mai mare ca a cit. c, pe baza secvenţei diferite a aminoacizilor, a rezistenţei mai mari la agenţii de solubilizare şi pe baza faptului că nu poate înlocui cit. c în reacţiile enzimatice specifice.

Citocromii c bacterieni, cu toată asemănarea de structură, diferă de cit. c ai eucariotelor, prin lipsa de reacţie cu citocromoxidaza mamiferelor.

Dintre numeroşii cit. c bacterieni se pot menţiona următorii: *cit.* c_3 din *Desulfonvibrio* şi alte bacterii sulfat-reductazice (cu 102, 107 sau 111 aminoacizi); *cit.* c_4 (gr. mol. 24.000, dimer) şi *cit.* c_5 (gr. mol. 24.400) din *Azotbacterii*, respectiv cit. c_5 din *Pseudomonas* (gr. mol. 10.100, cu 87 aminoacizi); cit. cc' din bacteria fotosintetizantă *alcalinigens* (127 aminoacizi); cit. c_{550} (gr. mol. 9.600 cu 82 aminoacizi), transportor de e^- al nitritreductazei din *Pseudomonas*; *cit.* c_{553} (gr. mol. 9.600, cu 82 aminoacizi)

și *cit.* c_{555} denumit și cit. c_6 sau *f* sînt părți componente ale reductazei sulfurilor din sulf-bacteriile verzi; *cit. f* se găsește în alga flagelată *Euglena gracillis* (gr. mol. 13.500, pH = 5,5) și în plantele superioare, unde participă, împreună cu cit. b_{559} în transportul e^- în fotosinteză; cit. f din spanac (gr. mol. 270.000) conține 8 subunități (gr. mol. 34.000) dintre care numai 4 au grupare hem.*[S. M. Rapoport (1969); H. Aebi (1975); H. Reinbothe (1975); L. Stryer (1975); H. D. Jakubke, H. Jesscheit (1976); L. Winkler (1982); Rawn J. D. (1973); Martin D. W. și colab. (1983)].*

1.3.8.5. *HIDROPEROXIDAZE: PEROXIDAZE, CATALAZE*

Peroxidazele și catalazele sînt *heminenzime* (cu Fe^{3+}), caracterizate prin spectre de absorbție tipice (mai ales în domeniul 400—450 nm) cu rol important în descompunerea apei oxigenate, toxică pentru celule (și a unor hidroperoxizi organici), după reacția generală: $AH_2 + H_2O_2 \rightarrow A + 2H_2O$.

În reacția cu *peroxidazele*, molecula de H_2O_2 se descompune în H_2O și O, care se fixează tranzitor (intermediar) la nivelul Fe^{3+} a grupării prostetice (R) și apoi reacționează cu H din substrat (AH_2) care se oxidează (A), concomitent cu formarea celei de a 2-a molecule de apă:

$$R{-}Fe{-}OH + H_2O_2 \rightarrow R{-}Fe{-}OOH + H_2O$$

$$R{-}Fe{-}OOH + AH_2 \rightarrow R{-}Fe{-}OH + H_2O$$

$$R{-}Fe{-}OH + H_2O_2 + AH_2 \rightarrow A + 2H_2O + R{-}Fe{-}OH$$

În reacția cu *catalazele* participă 2 molecule de H_2O_2:

$$H_2O_2 + H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$$

Ambele tipuri de enzime folosesc o moleculă de H_2O_2 ca acceptor de H, dar diferă în privința donorului de H. Peroxidazele au ca donor de H un substrat organic și folosesc H_2O_2 (toxică), ce se reduce la H_2O pentru dehidrogenarea (oxidarea) substratelor, ca de exemplu, fenoli, amine, ascorbat, ferocianură, citocrom c redus, formele leuco- a unor coloranți etc., la fel ca alte oxidaze. Catalaza este o enzimă cu funcție dublă: la concentrații ridicate de H_2O_2 folosește ca donor de H cea de a 2-a moleculă de H_2O_2, descompunînd astfel cu mare eficiență H_2O_2; în acest tip de reacție, caracteristică catalazei, cele 2 molecule de H_2O_2 participă într-o reacție de oxido-reducere în care una din molecule servește ca donor și cealaltă ca acceptor de H. În condițiile unor concentrații scăzute de H_2O_2 și ridicate în alte substrate, catalazele funcționează ca peroxidaze. Datorită asemănării proprietăților chimice și enzimatice, se obișnuiește reunirea peroxidazelor și catalazelor dub denumirea de *„hidroperoxidaze"*.

Împreună cu flavinenzimele generatoare de H_2O_2, hidroperoxidazele realizează oxidări „cuplate", în care două substrate diferite (RH_2 și $R'H_2$) sînt simultan dehidrogenate *(figura 1.125)*.

Descompunerea H_2O_2 poate să aibă loc și neenzimatic, sub efectul hemoproteidelor, de exemplu Hb și produșii săi de degradare, Hb-haptoglobină și chiar ioni liberi ai metalelor grele, agenți cunoscuți sub numele global de *„pseudoperoxidaze"*. Între cele două grupe de agenți care descompun H_2O_2 apar deosebiri de ordin cantitativ și calitativ: *a.* Peroxidazele și catalazele sînt de 10^3—10^6 ori mai active, comparativ cu Fe. *b.* Ele acționează ca enzime (efect termolabil), în timp ce Hb, Fe, Mn, Ni, Pt etc. acționează catalitic (efect termostabil).

Scanned with OKEN Scanner

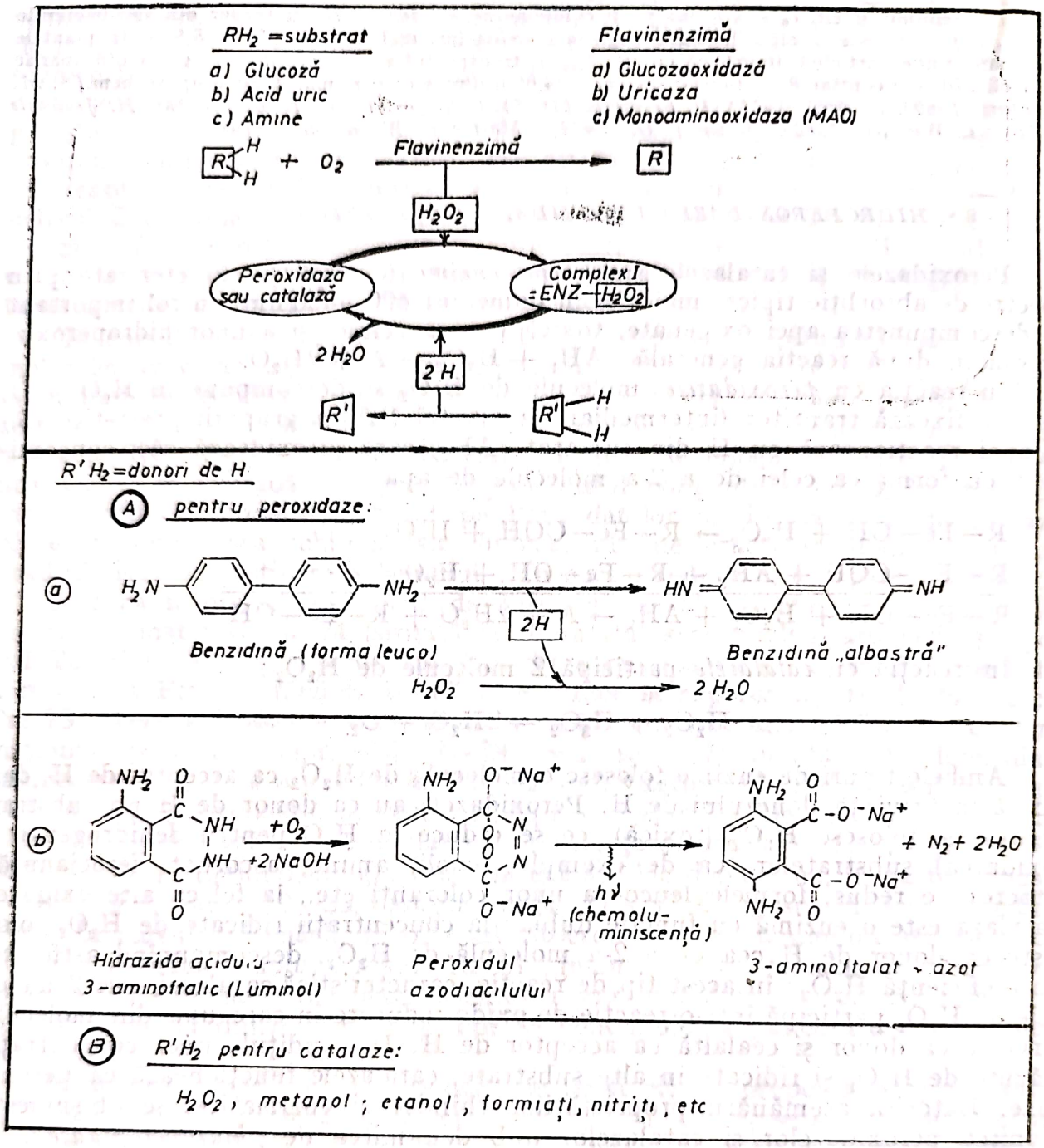


Fig. 1.125. Mecanismele de acțiune cuplate ale peroxidazelor și catalazelor și ilustrarea unor posibilități de dozare

Peroxidazele (descoperite de *Schönbein*) sînt foarte răspîndite în regnul vegetal, la animale (în eritrocite, leucocite, medulosuprarenale, lapte) și la microorganisme, cu excepția celor obligatoriu anaerobe (este posibil ca toxicitatea O_2 pentru acestea să se datorească absenței capacității de descompunere a H_2O_2 ce se formează în condiții aerobe).

Peroxidazele sînt oligomeri (gr. mol. 40.000); se cunosc 8 izoenzime ale acestora. Partea proteică are un conținut de 18% aminoacizi neutri iar centrul

activ conține hemul. Peroxidaza din tiroidă (gr. mol. 200.000) este alcătuită din trei subunități (gr. mol. 67.000). Peroxidazele provenite de la animale au ca parte prostetică o hemină verde (cu structura neprecizată), iar cele din plante o feriprotoporfirină (hemină roșie); cea mai cunoscută este cea din hrean, care se desface în hem și apoenzimă, prin tratare cu acetonă/HCl. Preparatele de peroxidază purificate sînt foarte stabile și pot fi conservate sub formă liofilizată sau în soluție apoasă (la 5°C) timp de mai mulți ani.

Dozarea peroxidazelor se face în prezența unor donori de H (se preferă 4-amino-antipirina), urmărind creșterea absorbției datorită descompunerii H_2O_2 la 510 nm la 25° C *(A. C. Maehly, B. Chance)*.

Importanța reacției peroxidazei în diagnostic rezultă din faptul că granulocitele mieloide prezintă o activitate puternic crescută în timp ce limfocitele, celulele reticulate din sarcoame și mieloame, sînt practic lipsite de activitate peroxidazică.

Peroxidaza și-a găsit largi aplicații în prepararea anticorpilor conjugați cu enzime datorită, pe de o parte, capacității de a forma compuși cromogeni și, pe de alta, stabilității lor convenabile. Astfel, imunoglobulinele „marcate" cu peroxidază permit identificarea antigenilor tisulari și dozarea antigenilor solubili și insolubili, în metodele imunochimice amplificate cu enzime *(L. A. Sternberger, P. H. Hardy, J. Cuculis, H. G. Meyer, 1970)*.

Peroxidaza (din hrean), împreună cu un donor cromogen este foarte utilă în determinarea substratelor în sistemele care formează H_2O_2, ca de exemplu în dozarea în laboratorul clinic a glucozei și galactozei, prin cuplarea reacției cu oxidazele specifice *(vezi cap. 1.1.3)* și a L-aminoacizilor, în prezența L-aminoacidoxidazelor respective.

Descoperirea apei oxigenate a avut loc în paralel cu ideea descompunerii sale în organismele vii *(Thenard, 1818)*; ulterior s-a stabilit natura de heminproteină a catalazei *(Euler, Zeile, Hellström, 1930)*. Catalaza din ficatul de vite este un tetramer (gr. mol. aprox. 245.000) alcătuit din subunități egale, cu hem (gr. mol 60.000—65.000) *(H. Sund, K. Weber, E. Molbert, 1967)*; are un conținut de 0,09% fier, $pH_i = 5{,}4$ și pH optim de activitate = 7. Catalaza obținută de la șoareci, șobolani, iepuri, manifestă un profil izoenzimatic ce sugerează două tipuri de subunități *(R. S. Holmes, L. W. Labaw, 1972)*.

Catalaza se găsește în toate organismele animale, în cantitățile cele mai mari în ficat, concentrată în niște particule subcelulare labile, denumite „peroxizomi", și în eritrocite, precum și în plante și în aproape toate microorganismele aerobe.

Catalaza are o foarte ridicată activitate, fiind capabilă să descompună 5×10^6 mol. H_2O_2/minut la 0°C; datorită acestei comportări, saturarea centrului activ al enzimei cu H_2O_2 este practic imposibilă, și, în consecință, dependența reacției de temperatură (energia de activare) este foarte scăzută comparativ cu a altor enzime ($Q_{10} = 1{,}03$). Activitatea sa este inhibată de H_2S, CN^{1-}, de compușii cu N_3 (de exemplu, N_3Na), de ascorbat și ascorbat + Cu^{2+}. Preparatele de catalază purificată sînt stabile sub formă de soluții apoase (la 4°C, pH 6—7, timp de 6—12 luni), dar își pierd activitatea prin congelare sau liofilizare (spre deosebire de peroxidaze). Dozarea se face prin urmărirea dispariției H_2O_2 la 240 nm *(R. F. Beers, Jr., I. W. Sizer, 1952)*.

Rolul biologic principal al catalazei se află în descompunerea H_2O_2 care are drept consecință și o protejare a oxidării Fe^{2+} din Hb; în condițiile în care acționează ca peroxidază participă în reacția: $CH_3—CH_2OH + H_2O_2 \rightarrow$

→ $CH_3—CHO + 2H_2O$, şi sugerează implicarea, cel puţin în parte, în metabolizarea alcoolului; în industrie serveşte pentru îndepărtarea H_2O_2 şi este utilizată în pasteurizarea laptelui şi în fabricarea brînzeturilor. La persoanele cu deficit genetic al acestei enzime, *acatalazemie*, se observă o creştere a metabolismului eritrocitar al glucozei pe calea ciclului pentozofosfatic, fără alte manifestări clinice deosebite.

1.3.8.6. *LEGHEMOGLOBINA : CROMOPROTEIDA VEGETALĂ*

Pigmentul de culoare roşie izolat din nodulii rădăcinilor de leguminoase *(H. Kubo, 1939)*, foarte asemănător cu mioglobina vertebratelor, denumit *leghemoglobina*, sau *legoglobina, Lb* (prefixul „leg"- derivă de la cuvîntul latin „legumen") este singura cromoproteidă heminică din regnul vegetal.

Leghemoglobina poate fi uşor extrasă cu apă din nodulii de pe rădăcinile de soia şi precipitată cu sulfat de amoniu (50—75%); prin cromatografie pe DEAE-celuloză se obţin 4 fracţiuni: Lba (gr. mol. 15.400), Lbb, Lbc (gr.mol. 16.800) şi Lbd, a căror molecule conţin partea prostetică, o protoporfirină cu fier autooxidabil şi un lanţ peptidic, cu aproximativ 140 aminoacizi, dintre care unii sînt comuni în tipurile a şi c, dar alţii sînt semnificativ diferiţi (dovadă a sintezei reglate prin gene diferite). Lb diferă de Hb vertebratelor printr-un conţinut mai sărac în His şi absenţa aminoacizilor cu sulf (Cis, Met). Din determinarea secvenţei complete a Lba rezultă următoarele: aminoacidul N-terminal este Val 1 (în Lbc este Gli), iar cel C-terminal, Liz 141; lanţul polipeptidic este lipsit de „centrul bazic" prezent în Hb; resturile de His 61 şi 92 par a fi implicate în legăturile cu hemul; toate resturile de Pro sînt situate în apropierea punctului unde lanţul este curbat; Pro 23, 38, 50, 56 iniţiază, în ordinea arătată, helixul B, C, D şi E, iar Pro 100 iniţiază helixul G, care ar fi pliat la fel cu cel din globinele vertebratelor. Dintre cei 10 aminoacizi consideraţi „invariabili" în diferitele Hb, în Lba se găsesc cel puţin 5. Compararea Lba cu lanţul γ din Hb umane sugerează similitudini ale codului genetic şi că diferenţele nu privesc decît o bază izolată; de asemenea repetări ale unor secvenţe (de exemplu plecînd de la resturile 1, 59 şi 114).

Părerile asupra rolului Lb sînt contradictorii, de exemplu, presupunerea că ar forma un complex reversibil cu N_2 nu s-a confirmat; rolul de sistem redox între bacteroizi şi N_2 contravine modului de repartizare al enzimelor; rolul de transportor de oxigen în bacteroizi sau în mitocondriile celulei rădăcinilor este infirmat de insensibilitatea la CO. Cert este că în timpul fixării N_2, nivelul Lb din nodulii rădăcinilor este ridicat şi că nitrogenaza necesită ATP şi de aceea se consideră că Lb uşurează difuziunea O_2 (care este, în sisteme nitrificante adecvate, de 8 ori mai mare în prezenţa Lb decît a apei) şi stimulează fosforilarea oxidativă, asigurînd astfel o producţie mărită de ATP ce creşte gradul de fixare al N_2; concentraţia Lb, care nu se găseşte decît în bacteroizii nitrificanţi, apare ca un indicator cantitativ de fixare al N_2 *(N. Ellfolk, 1972)*.

1.3.9. HETEROPROTEIDE CU MAGNEZIU. PIGMENŢII CLOROFILIENI

Sub denumirea uzuală de „clorofilă" se înţelege un complex de pigmenţi de culoare verde, izolaţi din frunzele verzi prin metoda cromatografiei pe coloană *(M. S. Ţvet, 1903—1910)*. Cei mai importanţi sînt *clorofila a* şi *b* şi *bacterio-*

clorofila (în măsură mai mică), care au structuri similare şi cu protoporfirina din Mb şi Hb, de care diferă prin prezenţa Mg^{2+} (în locul Fe), printr-un ciclu suplimentar (V) şi prezenţa unui alcool superior : fitolul sau farnezolul. Prin îndepărtarea Mg se obţin *feofitinele ;* prin eliminarea alcoolului, *clorofilidele*, hidrosolubile, şi prin eliminarea ambelor apar *feoforbidele.* Atît clorofila cît şi derivaţii menţionaţi sînt puternic coloraţi şi înzestraţi cu o fluorescenţă intensă în solvenţii organici lipsiţi de apă, proprietăţi ce servesc pentru identificarea lor.

Clorofila a este prezentă în toate plantele autotrofe (lipseşte din bacterii) ; *clorofila b* o însoţeşte în cloroplastele celor mai multe plante (lipseşte din algele albastre, brune roşii, diatomee şi dintre algele verzi, de la vaucherii) ; *bacteriofilina* apare în sulfbacteriile verzi şi purpurii.

În frunzele verzi proaspete se găsesc aproximativ 0,1—0,3% clorofile (0,3—1,2% din greutatea uscată), predominînd clorofila a (de 3 ori mai multă decît b). În general, plantele din familiile care se găsesc în evoluţie, conţin cantităţi mai mari de clorofilă decît cele pe cale de dispariţie, de exemplu, în graminee se găseşte 3,4 g/kg şi la cicadee numai 1,2 g *(A. V. Blagovescenski, 1950) ;* la aceeaşi specie, proporţia este mai mare în frunzele plantelor din umbră, de culoare verde închisă (pînă la 8% din greutatea uscată) ; este concentrată în grana cloroplastelor, unde poate atinge o concentraţie de 30%, respectiv de 0,2 M de clorofilă.

1.3.9.1. *STRUCTURA ŞI PROPRIETĂŢILE CLOROFILEI ŞI DERIVAŢILOR*

În stabilirea structurii moleculei de clorofilă a servit saponificarea cu KOH alcoolic, prin care s-a obţinut un acid bibazic caracteristic, denumit *acid clorofilinic* (sub formă de sare de K) sau *clorofilina* şi doi alcooli : fitolul şi metanolul, conform reacţiei :

$$C_{32}H_{30}ON_4Mg\begin{matrix}COOCH_3\\COOC_{20}H_{39}\end{matrix} + 2\,KOH \rightarrow C_{32}H_{30}ON_4Mg(COOK)_2 + C_{20}H_{39}OH + CH_3OH$$

Clorofila a — *Clorofilina a* (sare de K) — *Fitol* — *Metanol*

Fitolul este un alcool cu 20 atomi de C şi o dublă legătură :

$$HO-CH_2-CH=\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{C}}[(CH_2)_3-\underset{\displaystyle CH_3}{\overset{|}{CH}}-]_3-CH_3,$$

care se găseşte şi în vitamina K_1 *(vezi 2.1.6).*

Fitolul conferă unei părţi a moleculei un caracter hidrofob-lipofil (insolubilitatea în apă şi solubilitatea în alcoolul metilic, etilic, butilic, în eter etilic, acetonă, sulfură de carbon etc.), în timp ce macrociclul tetrapirolic imprimă, unei părţi a moleculei, un caracter hidrofil. Datorită acestor particularităţi, molecula clorofilei se orientează caracteristic în structura stratului dublu lipoproteic din membrana thilacoizilor şi respectiv în membranele artificiale „model".

Scanned with OKEN Scanner

Alcătuirea moleculei clorofilei *(Willstätter R., Stoll A.)* și formula structurală *(Linstead, 1940)* a fost confirmată prin sinteza totală *(R. B. Woodward, 1956—1960)*.

Din formulele clorofilelor a, b și bacterioclorofilei *(figura 1.126)* rezultă că elementul caracteristic, comun, este ciclul porfirinic, care, spre deosebire de al cromoproteidelor cu hem *(figura 1.98 și 1.99)*, posedă un ciclu în plus, notat cu *V* (cele două poziții substituibile se notează cu 9 și 10) și are Mg^{2+} în loc de Fe.

Clorofila a prezintă următoarele substituiri: patru metili în pozițiile 1, 3, 5, 8, un vinil în 2 și un rest de acid propionic în 7 (acești substituenți și situarea lor este identică cu cea din protoporfirina IX, partea prostetică a Mb, Hb etc.); în 4 are un etil. Acidul propionic (din poziția 6 a protoporfirinei IX) apare aici ca și cum ar fi oxidat la C β (C 9) sub formă de cetonă și legat prin C α (C 10) cu C din puntea metenică γ dintre pirolii III—IV, formînd astfel un nou ciclu, *izociclul V*. Metalul caracteristic este Mg^{2+}, care se leagă de cei patru atomi de N,

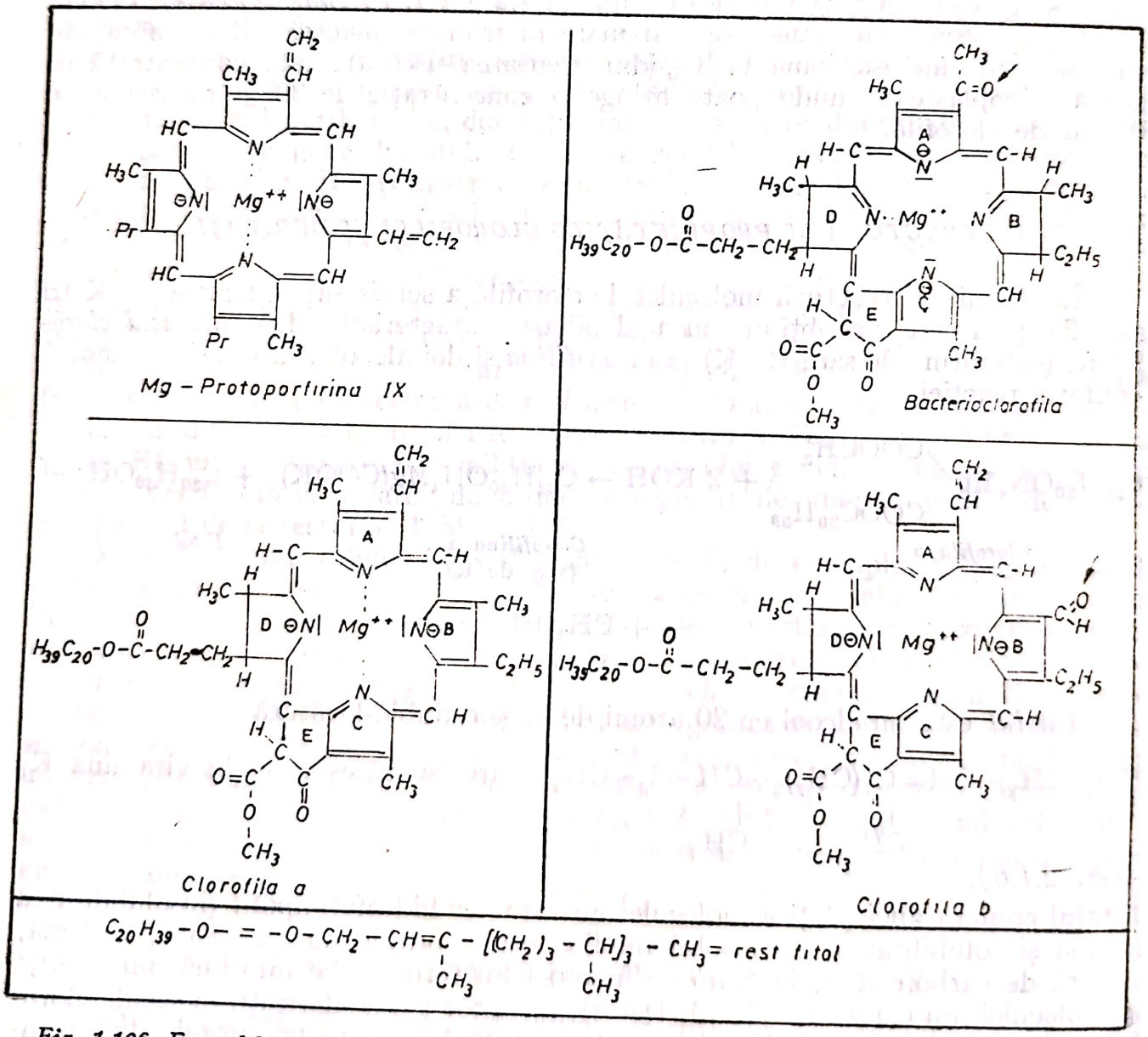


Fig. 1.126. Formulele Mg-protoporfirinei IX și a unor clorofile (săgețile indică grupările care le diferențiază)

dintre care cu doi prin valenţe principale *(L. Ciugaev, 1907)*. Este posibil ca molecula clorofilei *a* native să posede încă o grupare -COOH, labilă (probabil la C 10) şi care ar lua naştere prin fixarea CO_2 în procesul asimilării clorofiliene (fotosinteză) *(O. Warburg, G. Krippahl, 1956)*.

Acidul clorofilinic sau *clorofilina a*, cu -COOH în 10 şi acid propionic în 7 prezintă, spre deosebire de clorofilă, caracter hidrofil, datorat izociclului *V* şi grupărilor -COOH libere; esterificarea -COOH din 10 cu metanol şi a acidului propionic din 7 cu fitol conduce la clorofila a, iar cu farnezol, la bacterioclorofilă.

Clorofila b are o structură similară cu a clorofilei *a*, dar în locul $-CH_3$ (din poziţia 3) are o grupare -CHO (formil); aceeaşi diferenţă apare şi în acidul clorofilinic *b*, faţă de *a*.

Bacteriofilina se deosebeşte de clorofila *a* prin înlocuirea vinilului din 2 cu o grupare de acid acetic şi prin saturarea unei duble legături din ciclul II (cu apariţia a 2 H în plus în 3 şi 4).

Protoclorofila, prezentă în cantităţi mici în frunzele etiolate, în tegumentele seminţelor de cucurbitacee, în plantulele de orz etiolate, diferă de clorofila *a* prin lipsa a 2 atomi de H din ciclul IV; ea pare a servi ca precursor al clorofilei *a*, transformarea avînd loc sub influenţa luminii.

Clorofilele în soluţii alcoolice au o culoare verde-albastră şi o fluorescenţă roşie-rubinie. Soluţiile diluate în eter etilic manifestă două maxime în roşu şi albastru, în cazul clorofilei *a*; clorofila *b* are maximul din roşu deplasat spre stînga şi cel din albastru spre dreapta, iar bacteriofilina are cele două maxime mai distanţate şi prezintă şi un al treilea pic de absorbţie *(figura 1.127* şi *tabelul 1.48)*.

Faptul că spectrele de absorbţie ale clorofilelor diferă de a suspensiilor şi de a cloroplastelor native indică asocierea, în celulă, a clorofilei cu proteinele sub forma unor complexe mult mai stabile. Prin scindare, chiar în celulele vii, de exemplu,

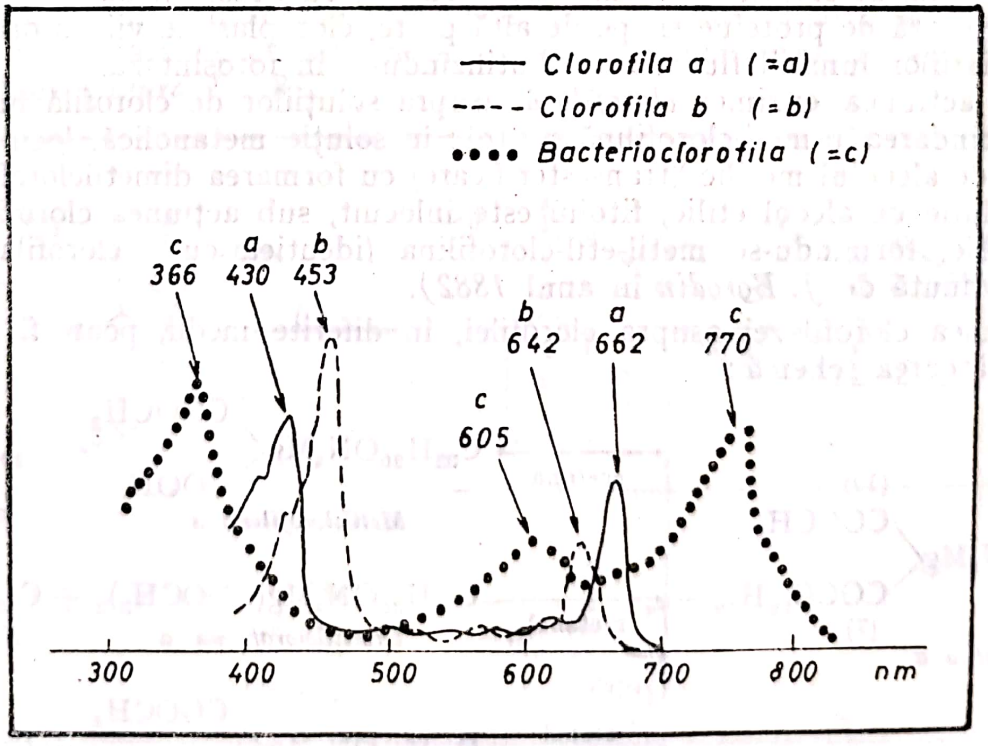


Fig. 1.127. Spectrele de absorbţie ale clorofilei a, b şi ale bacterioclorofilei (după Smith, din N. Sălăgean, 1972)

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 1.48

Spectrele de absorbţie ai unor clorofile (după **H. Reinbothe, 1975**)

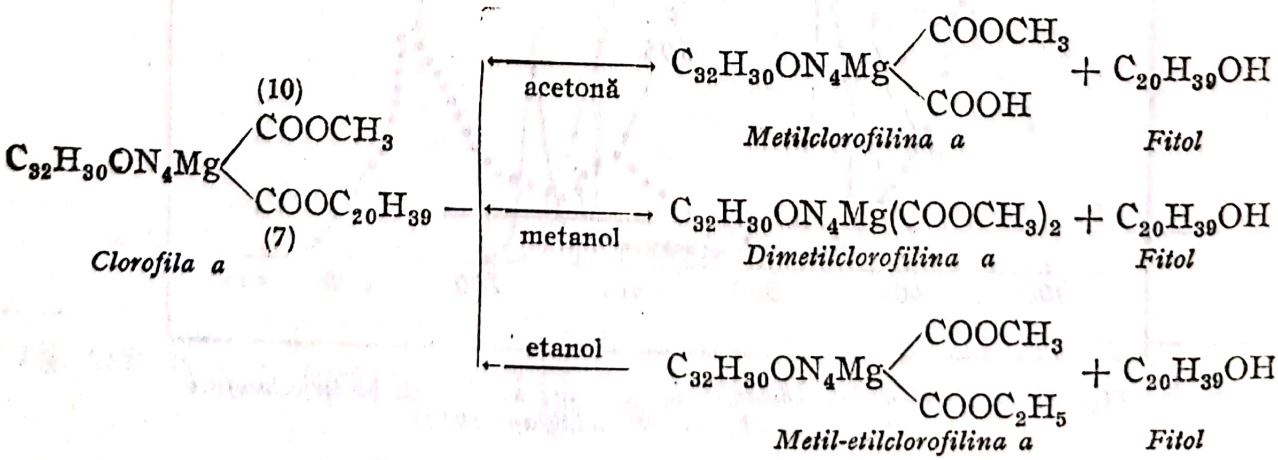
Tip de clorofilă	Maximul de absorbţie în domeniul spectral roşu (nm)	
	în eter	*„in vivo"*
Clorofila a	660	668—700
Clorofila b	643	650
Clorofila c	625	645
	690	740
Pigment 700	—	700
Bacterioclorofila a	773	850, 870, 890
Bacterioclorofila b	795	1017
Chlorobium-clorofila	650	725
(cu farnezil în loc de fitil)	660	740—750

cu actinomicina D, clorofila îşi pierde stabilitatea şi este supusă unor degradări cu decolorarea celulelor verzi. Clorofila nativă apare nu numai sub formă de monomeri, ci şi sub formă de dimeri, trimeri şi polimeri mai înalţi, care se pot recunoaşte prin spectrul caracteristic de absorbţie şi prin fluorescenţa diferită de a monomerilor.

Fluorescenţa roşie (cu maximul la aproximativ 680 nm) a clorofilei dizolvate în solvenţi organici dispare în prezenţa apei (cînd soluţia devine coloidală); de asemenea fluorescenţa este mai slabă în cloroplaste, respectiv în frunze (0,005—0,15% faţă de clorofila dizolvată în solvenţii organici). Această comportare se explică prin faptul că în cloroplaste numai o mică parte a pigmenţilor clorofilieni este sub formă de soluţii adevărate (de exemplu, cu lipidele), majoritatea fiind, probabil, legată de proteine şi, pe de altă parte, cloroplastele vii absorb majoritatea radiaţiilor luminii fluorescente, utilizîndu-le în fotosinteză.

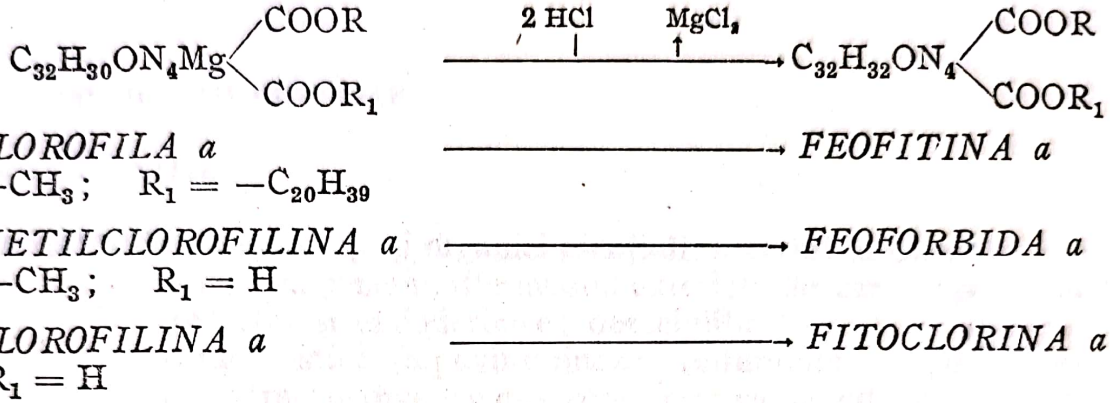
Prin acţiunea enzimei *clorofilază* asupra soluţiilor de clorofilă în acetonă are loc scindarea în metilclorofilină şi fitol; în soluţie metanolică, locul fitolului este luat de alcoolul metilic (transesterificare) cu formarea dimetilclorofilinei; la fel, în soluţie de alcool etilic, fitolul este înlocuit, sub acţiunea clorofilazei, cu alcool etilic, formîndu-se metil-etil-clorofilina (identică cu „clorofila cristalizată", obţinută de *J. Borodin* în anul *1882*).

Acţiunea clorofilazei asupra clorofilei, în diferite medii, poate fi ilustrată prin următoarea schemă:



Reacţia fiind enzimatică este reversibilă şi permite obţinerea clorofilei iniţiale *(a, b)* din clorofilinele alchilate respective.

Acizii, de exemplu, HCl dil., *elimină magneziul* din clorofile şi derivaţii lor, înlocuindu-l cu doi H. Din clorofilele *a* şi *b* se obţin *feofitina a*, respectiv *b*, ambele de culoare brună ; prin reintroducerea Mg se refac moleculele iniţiale. Din clorofilă (în mediu puternic acid) şi din metilclorofiline, prin eliminarea Mg se obţin *feoforbidele*, de culoare brună ; de la clorofilina *a* se obţine *fitoclorina a*, de culoare verde, în soluţie de eter etilic, şi albastră, în soluţie de HCl, iar de la clorofilina *b* se obţine *fitorodina*, de culoare roşie rubinie, în soluţie de eter etilic, şi albastră, în soluţie de HCl. Acţiunea HCl asupra clorofilei *a* şi a derivaţilor săi poate fi ilustrată prin următoarea schemă :



Reducătorii puternici (de exemplu, Pd/H_2) reduc clorofilele la porfirinogeni (incolori). *Acidul ascorbic* produce, prin reacţii reversibile, clorofile „reduse" *(figura 1.128)*, care interesează în special izociclul *V (B. Bachow, H. König, 1958)* ; această reacţie este puternic inhibată de compuşii polienici cu duble legături conjugate (de exemplu, carotenoide).

Clorofila *a*, în soluţie alcoolică, este autooxidabilă şi formează mai mulţi compuşi de oxidare de culoare verde, dintre care unii prezintă —OH la C 10 (oxiclorofile) *(figura 1.128)*.

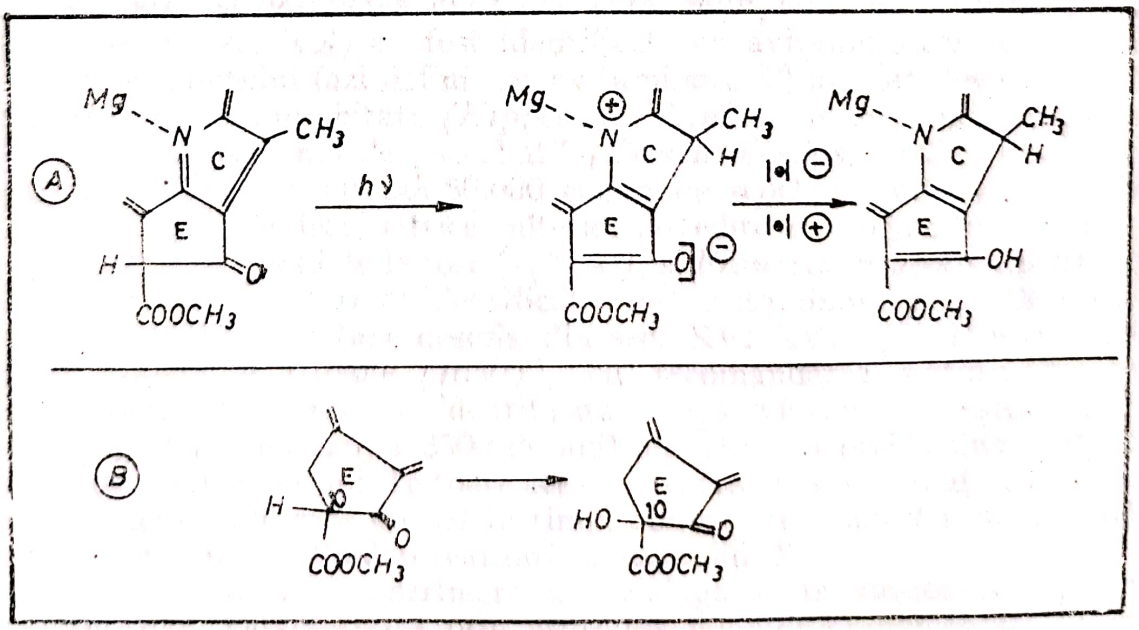


Fig. 1.128. Formarea clorofilelor „reduse" (A) şi a oxiclorofilelor (B).

Clorofilele prezintă o importanţă deosebită ca „instrumente" moleculare ale transformării energiei luminoase în energie chimică.

Preparatele de clorofilă, obţinute prin extragerea frunzelor (de exemplu, din urzici) cu acetonă apoasă şi adsorbite pe talc, sau prin alte metode, sînt utilizate larg ca pigmenţi (coloranţi) alimentari, cosmetici, industriali; ca pro-oxidanţi (de exemplu, în autooxidarea lipidelor) şi ca antiseptice sau pentru efectul topic, de exemplu, în paste de dinţi, gume de mestecat, unguente dermice etc. (Pentru detalii asupra structurii şi importanţei clorofilei a se vedea: *C. Bodea şi colab., 1964; N. Sălăgean, 1972; Ştirban M., 1981*).

Scanned with OKEN Scanner

Capitolul II

2. BIOCATALIZATORI

2.1. VITAMINELE

2.1.1. CONSIDERAȚII GENERALE

2.1.1.1. *DEFINIȚIE*

VITAMINELE sînt compuși organici esențiali, necesari în cantități minime, catalitice, și care provin, în general, din mediul exterior, de care organismul este separat prin bariere ecto- și endodermice; dezechilibrul aportului sau utilizării conduce la boli caracteristice (hipovitaminoze, avitaminoze, hipervitaminoze). În studiul vitaminelor tractul digestiv este considerat ca făcînd parte din mediul exterior, precizare importantă, deoarece numeroase vitamine sînt produse, prelucrate sau consumate de către flora microbiană din intestin, modificînd astfel calitativ și cantitativ aportul real al vitaminelor în organism.

2.1.1.2. *ISTORIC*

Descoperirea vitaminelor a parcurs mai multe etape:

a. Observarea și descrierea unor boli care, mult mai tîrziu, după descoperirea vitaminelor (sec. XX) au fost identificate cu avitaminozele; de exemplu, manifestările scorbutului (azi definit ca avitaminoză C) au fost descrise de către medicii și istoricii din antichitate *(Hippocrate, Plinius)*, în evul mediu la navigatori, cînd apare și termenul de „scorbut" *(Enricus Cordus, 1543)*; în expediția lui Napoleon în Egipt se citează 50.000 cazuri de scorbut. Tratamentul empiric utiliza plante verzi, conifere, citrice, ulterior dovedite ca bogate în vitamina C. *Gaspar Casal* descrie „mal de la rosa" *(1730)*, și *Francesco Frapolli* „pella-agra" (piele aspră) *(1731)*, ulterior identificate cu avitaminoza P. P. Rahitismul („boala englezească") este bine descris din sec. XVI-XVII *(B. Renser (1582), D. Whistler (1645), F. Glisson (1650))*, cu recomandarea unturii de pește *(Trousseau, 1882)*. Hemeralopia, identificată cu lipsa vitaminei A, este semnalată în papirusul *„Ebber"* (de acum 3500 de ani) iar beri-beri (avitaminoza B_1) este menționată de peste 2500 ani. În toate aceste cazuri și în altele similare este vorba de descrierea unor boli, care preced în timp, cunoașterea cauzelor ce le produc, descoperirea vitaminelor fiind o realizare a secolului XX.

b. Etapa cercetărilor experimentale (fiziologice), de descoperire propriu-zisă a vitaminelor, caracterizată prin utilizarea regimurilor alimentare sintetice sau carențiale, capabile să determine apariția modificărilor patologice specifice

Scanned with OKEN Scanner

avitaminozelor. S-a observat că şoarecii hrăniţi cu lapte proaspăt se comportă normal, în timp ce şoarecii hrăniţi cu apă, proteinele, lipidele şi glucidele extrase din lapte şi cu cenuşa obţinută prin incinerarea laptelui (săruri minerale, oligoelemente) prezentau tulburări grave şi mureau în primele luni de experiment. Deoarece regimul era asigurat global şi cu principiile alimentare (cunoscute), s-a sugerat existenţa în hrana naturală a unor compuşi organici, încă necunoscuţi, absolut necesari dezvoltării normale şi vieţii animalelor (*Lunin*, 1881). Cercetările în continuare *(Hopkins, 1912)*, ilustrate în *figura 2.1.A* relevă stagnarea creşterii şi pierderea în greutate a şobolanilor tineri hrăniţi cu o dietă sintetică (alcătuită din toate principiile alimentare cunoscute, apă şi săruri minerale) faţă de un alt grup hrănit cu lapte proaspăt; schimbarea regimului, după 20—30 zile, inversează comportarea celor două loturi *(figura 2.1. B)*, dovedindu-se astfel experimental existenţa în laptele proaspăt a unor principii alimentare, denumite „factori accesori".

Plecînd de la observaţia *(Eijkman, 1890—1898)* că prizonierii hrăniţi cu orez decorticat se îmbolnăveau de „beri-beri" şi că păsările care consumau aceeaşi hrană manifestau o boală similară, „polinevrită aviară", *Kazimierz Funk (1911—1914)* izolează din cojile (tărîţele) de orez o substanţă cu azot, care vindecă polinevrita aviară şi pentru care propune denumirea de *vitamină* (amină vitală).

c. Etapa izolării, purificării, stabilirii structurii chimice, a sintezei şi elucidării rolului şi mecanismelor biochimice şi a aplicării profilactice sau terapeutice a vitaminelor. În prezent se cunosc proprietăţile fizico-chimice ale vitaminelor, caracteristicile carenţelor, acţiunea şi rolul lor, şi, în consecinţă, preocupările majore ale vitaminologiei se axează pe posibilităţile de obţinere, testare şi condiţionare, în scopul valorificării în terapie şi în elaborarea unor măsuri generale de profilaxie pe plan mondial, precum şi pe elucidarea mecanismelor de acţiune biochimică, pînă la nivel subcelular şi molecular-enzimatic *(vezi. 2.1.1.4)*.

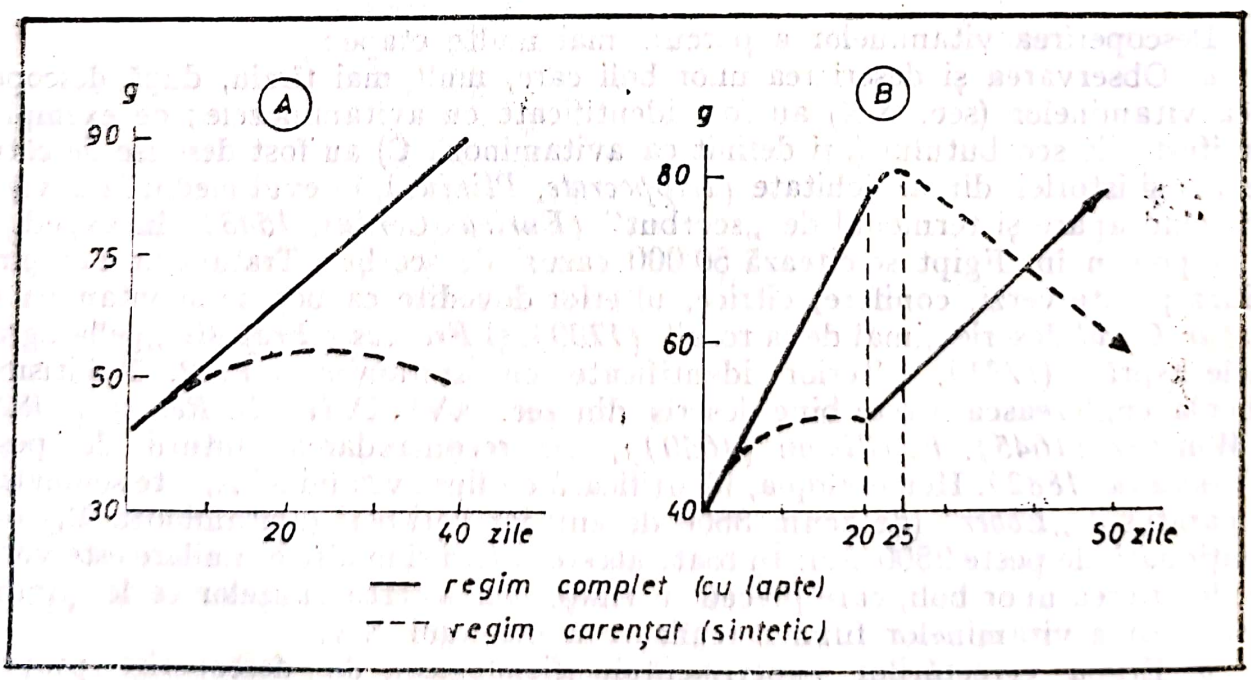


Fig. 2.1. Variaţia greutăţii şobolanilor hrăniţi cu regim complet (cu lapte) şi sintetic (A) şi la schimbarea regimului (B) (după F.G. Hopkins, 1912).

Pentru primele vitamine descoperite (A, D, B_1, C, P.P.), distanţa dintre descrierea bolilor şi descoperirea vitaminelor s-a extins pe perioade de sute şi mii de ani; pentru vitaminele descoperite mai recent (B_{12}, acid folic), etapele sînt mai scurte şi chiar inversate.

2.1.1.3. *DEFINIREA STĂRILOR PATOLOGICE DETERMINATE DE CARENŢA SAU EXCESUL VITAMINELOR*

Meritul lui *Funk* este nu numai de a fi descoperit prima vitamină (în realitate un amestec) ci şi de a fi enunţat concepţia că „bolile de tipul beri-beri şi scorbutului nu îşi au originea în infecţii sau intoxicaţii, ci în lipsa unor substanţe necunoscute din alimentaţie şi care sînt neapărat necesare, în cantităţi foarte mici, sănătăţii şi vieţii".

În cazul în care necesităţile în vitamine nu sînt asigurate se instalează o carenţă gradată, progresivă, de la forme uşoare (precarenţe) pînă la formele grave, chiar mortale. Noţiunea de *„precarenţă"*, deşi discutabilă, este de mare interes deoarece se apropie mai mult de starea normală decît de cea patologică şi apare, în prezent, cu o largă extindere în numeroase ţări. Ca un argument pentru susţinerea existenţei acestei stări se poate menţiona observaţia că microleziunile corneei produse prin expunere la razele U.V. se vindecă spontan la animalele hrănite normal şi mult mai greu la animalele parţial carenţate în vitamină A, deşi acestea nu prezentau nici un alt semn aparent al carenţei (Moriquard). Între aceste forme aproape inobservabile („ascunse", „oculte") şi formele grave denumite *avitaminoze* (în prezent aproape dispărute) se situează o zonă largă de stări de *hipovitaminoză*, de obicei mai uşoare şi în mare măsură reversibile, recunoscute prin manifestările clinice şi biochimice caracteristice, de exemplu, valoarea subnormală a nivelului vitaminei respective din sînge sau urină, alterări ale indicatorilor biochimici condiţionaţi de lipsa unor vitamine (de exemplu, creşterea activităţii fosfatazei alcaline în prerahitism) şi care, prin marea lor răspîndire, constituie o problemă de o deosebită importanţă medico-socială.

După cauzele care le produc, se disting hipo- şi avitaminozele *primare*, datorite lipsei de aport, şi *secundare* sau *condiţionate*, determinate de alţi factori, legaţi în special de persoana în cauză.

În prima categorie se includ carenţele determinate de lipsa reală a vitaminelor din alimente (alimentaţie deficitară, subnutriţie) sau ca urmare a distrugerii lor din alimente (prin prelucrare, conservare etc.); de tulburările de absorbţie (de exemplu, lipsa bilei, pentru vitaminele liposolubile, şi afecţiunile intestinale, pentru cele hidrosolubile); alterarea florei microbiene intestinale, aceasta fiind o sursă de vitamine ce asigură o cotă importantă din necesităţile organismului (dezechilibrul florei, „disbioza", poate apare în condiţii patologice sau prin administrarea unor medicamente, de exemplu, sulfamide, antibiotice); imposibilitatea transformării provitaminelor în vitamine etc.

Între cauzele care pot produce hipo- sau avitaminoze secundare se pot menţiona necesităţile crescute din anumite stări fiziologice speciale sau patologice, cînd aportul suficient pentru persoanele sănătoase nu asigură necesarul real pentru aceste situaţii, cum ar fi în perioada de creştere, graviditate, lactaţie, efort fizic, alcoolism cronic, boli infecţioase; astfel de exemplu, în tuberculoză *(I. Gonţea)*, pentru asigurarea nivelului normal al ascorbinemiei şi ascorbinuriei sînt necesare cantităţi de 2—3 ori mai mari de vit. C decît la persoanele

sănătoase; în plus, tratamentul cu hidrazida acidului izonicotinic (HIN) sau cu acid para-amino-salicilic (PAS) accentuează consumul și mărește necesitățile în vit. C și dacă aportul este insuficient (egal cu al persoanelor sănătoase), bolnavul este expus la hipovitaminoza C; situația este similară și pentru unele vitamine din grupul B, precum și pentru vitaminele liposolubile, de exemplu, vitamina A a fost considerată chiar ca vitamină „antiinfecțioasă". Alte cauze sînt prezența în alimente a unor *antivitamine* naturale (în alimentele „pelagrogene"): administrarea unor medicamente care antagonizează vitaminele, sau afectarea unor organe implicate în exercitarea efectului unor vitamine, de exemplu, ficatul (unde vitaminele K participă în biosinteza protrombinei) etc.

În clinica umană, spre deosebire de modelele experimentale pe animale, apar în special carențe complexe („policarențe"), care survin în dezechilibre alimentare (de exemplu, în regimul bogat în glucide necesitățile de vit. B_1 sînt mai mari), în infecții, *în cursul administrării unor medicamente* etc. De asemenea, sînt frecvente stările de *latență clinică*, în care semnele carenței apar în momentul în care organismul este slăbit, din alte motive. Se citează, în acest sens, o epidemie de scorbut la sugari hrăniți cu lapte sterilizat în cursul îmbolnăvirii de rugeolă; sugarii fără rugeolă nu prezentau, la același regim, carența în vitamină C. Este interesantă observația lui V. Babeș, citată de vitaminologi de renume (Moriquard, Bigwood) cu privire la un lagăr de prizonieri din primul război mondial. Inițial sănătoși, alimentați cu un regim deficitar, o parte din prizonieri s-au îmbolnăvit de scorbut, alții de pelagră, deși hrana și condițiile de viață erau identice. Explicația era că primii, ruși, proveneau din regiuni scorbutice; ceilalți, români, erau originari din satele cu pelagră. Carența globală, comună, a scos în evidență stări precarențiale diferite, în dependență de antecedente, adică de „individualitatea biochimică" a persoanelor în cauză. În manifestarea unei hipo- sau avitaminoze este posibil ca semnele carenței datorite unei vitamine, cu evoluție mai rapidă, să mascheze cele ale altora, precizare importantă pentru clinica umană, unde de obicei nu apar hipo- sau avitaminoze pure, ci manifestări policarențiale, aspect ce le diferențiază de carențele provocate experimental.

Hipervitaminozele se datoresc unui exces de vitamine sau neutilizării acestora. În mod obișnuit apar rar din cauza unui exces alimentar, dar se pot produce în urma consumării unor alimente sau preparate foarte bogate în vitamine sau provitamine (ficatul unor pești oceanici, untura de pește, morcovi) sau în urma unei terapii intense, abuzive, cu vitamine; excesul unei singure vitamine are, adesea, consecințe și asupra efectului altor vitamine. Formele de manifestare ale hipervitaminozelor pot fi, la fel ca în cazul hipovitaminozelor, mai ușoare și reversibile, dar și grave, adevărate „intoxicații" cu vitamine. Sînt de menționat și intoleranța unor persoane față de medicamentele vitaminice (de exemplu, față de vit. B_1) și efectele teratogene ale vitaminelor la gravide, cu apariția de malformații ale fetusului.

2.1.1.3.1. VITAMINELE CA „FACTORI ESENȚIALI"

Vitaminele sînt factori *„esențiali"*, adică absolut necesari tuturor speciilor, inclusiv vegetalelor și microorganismelor *(Schopfer, Lwoff, 1934)* și *„exogeni"*, criteriu de diferențiere față de hormoni (endogeni). Noțiunea de „exogen" ce caracterizează vitaminele, respectiv imposibilitatea de a fi sintetizate, variază

de la o specie la alta şi chiar în cadrul aceleiaşi specii (de exemplu, la mutanţii unor microorganisme faţă de tipul iniţial). De aceea, biosinteza vitaminelor trebuie privită în mod concret, pentru fiecare specie şi vitamină în parte, de exemplu, unele vitamine pot fi *parţial* sintetizate de către om şi alte mamifere (vit. P.P., avînd ca precursor triptofanul); unele microorganisme pot lega între ele părţile din care este alcătuită o vitamină, de exemplu, nucleul tiazolic şi pirimidinic din vit. B_1, să sintetizeze una din aceste părţi cînd o au la dispoziţie pe cealaltă sau să sintetizeze integral vitamina. De asemenea, necesităţile sînt specio-dependente, de ex. vit. C este necesară numai pentru om, primate şi cobai; alte specii au nevoie de această vitamină, dar o pot sintetiza în cantităţi suficiente încît se pot lipsi de aportul exogen; carenţa PAB-ului determină încetarea creşterii păsărilor şi decolorarea părului şobolanilor (acromotrichie), manifestări ce nu apar la om.

O atenţie specială se acordă *vitaminogenezei* realizată de flora intestinală, deoarece aceste microorganisme pot produce cantităţi apreciabile de vitamină K, PAB, biotină, acid pantotenic, acid folic, care pot acoperi (cel puţin parţial) necesităţile normale ale omului; în schimb oferta de nicotinamidă, tiamină, riboflavină, piridoxamină este insuficientă şi obligă la un aport alimentar. *Tabelul 2.1* prezintă unele microorganisme producătoare de vitamine, dar aceste date au numai o valoare orientativă şi trebuie privite cu rezervă deoarece sînt obţinute în condiţiile producerii vitaminelor în mediile de cultură care nu reflectă factorii caracteristici ai tractului digestiv şi randamentul real din organism. În *tabelul 2.2* se prezintă unele informaţii asupra răspîndirii vitaminelor în alimente.

TABELUL 2.1

Vitaminogeneza unor microorganisme

Microorganisme	B_1	B_2	PP	B_6	Pantotenic	Biotina	Folic	Inozitol
Pseudomonas fluorescens	+	+	+	+	+	+	+	+
Proteus vulgaris	+	+	+	+	+	+	+	+
Clostridium butylicum	+	+	+	+	+	+	+	+
Aerobacter faecalis	0	+	+	0	+	0	0	0
Escherichia coli	+	+	+	0	0	+	0	0
Bacillus mesenthericus	+	++	+	0	0	0	0	0
Bac. alcaligenes faecalis	+	+	+	0	0	+	0	0

2.1.1.4. *ROLUL VITAMINELOR ÎN SISTEMELE BIOCHIMICE*

O preocupare principală a etapei actuale de cercetare a vitaminelor *(vezi 2.1.1.2.)* este elucidarea rolului şi a mecanismelor prin care ele acţionează în organism, iniţiată de observaţia că vit. B_2 este componenta activă a „fermentului galben respirator" *(Warburg, Christian, 1932)* şi care a fundamentat concepţia că multe vitamine funcţionează ca părţi active (coenzime) ale enzimelor. Sub această şi/sau alte forme, vitaminele participă în realizarea unor importante procese biochimice.

Scanned with OKEN Scanner

TABELUL 2.2

Răspîndirea unor vitamine în alimente (parte comestibilă)

ALIMENT (valoare medie/100 g)	A (U.I.)	Caroten (mg)	D (U.I.)	E (mg)	K (mg)	B_1 (mg)	B_2 (mg)	B_6 (mg)	PP (mg)	FOLIC (mg)	C (mg)
Lapte de vacă integr.	150	0,035	3	0,10	0,03	0,045	0,200	0,100	0,200	0,005	2,0
Smîntînă	1000	0,300	20	1,20	—	0,040	0,140	—	—	—	—
Unt	3500	0,700	50	2,50	—	0,050	0,400	0,500	1,500	—	1,0
Brînzeturi	1200	0,130	30	0,60	—	—	—	—	—	—	—
Ou găină	2000	0,700	100	1,20	0,20	0,120	0,360	0,400	0,200	—	—
Carne de vită	30	0,006	10	0,30	0,20	0,160	0,250	0,600	4,000	—	10,0
Carne de porc	60	0,004	10	—	—	0,900	0,200	0,800	6,000	—	10,0
Carne de pasăre	60	0,015	—	—	0,30	0,150	0,160	0,500	8,000	—	—
Ficat	25000	2,500	40		0,5	0,370	3,500	0,600	17,000	0,100	—
Salam	80	—	—	—	—	0,350	0,200	—	5,000	—	—
Pește slab	200	0,010	200	—	—	0,160	0,150	0,300	4,000	—	1,0
Pește semigras	600	—	—	—	—	0,150	0,160	0,200	3,000	—	1,0
Orez glasat	—	0,030	—	—	—	0,040	0,030	0,200	1,000	—	—
Făină de grîu	—	0,120	—	10,00	—	0,300	0,120	0,400	3,000	1,200	0
Făină de porumb	—	0,400	—	—	—	0,350	0,200	0,100	1,000	—	—
Pîine integrală	—	—	—	8,00	0,28	0,250	0,150	0,250	2,000	0,008	—
Pîine albă	—	—	—	4,00	—	0,100	0,050	0,150	1,000	0,005	—
Fasole uscată	—	0,100	—	—	—	0,550	0,250	0,350	2,500	0,700	—
Mazăre uscată	—	0,150	—	5,00	0,28	0,700	0,300	0,250	3,000	0,300	—
Cartofi	—	0,030	—	—	0,08	0,120	0,100	0,250	1,500	0,500	14,0
Fasole verde	—	0,500	—	—	—	0,150	0,200	0,150	0,500	—	20,0
Morcovi	—	6,000	—	3,00	0,10	0,080	0,070	0,200	1,000	0,060	7,0
Salată verde	—	2,000	—	0,60	0,08	0,080	0,120	0,200	0,200	0,100	50,0
Spanac	—	7,000	—	6,00	5,00	0,150	0,220	0,800	0,800	0,280	50,0
Tomate (roșii)	—	2,500	—	0,70	0,12	0,070	0,045	0,200	0,300	0,130	25,0
Varză albă	—	0,080	—	—	2,00	0,100	0,080	0,100	0,500	—	50,0
Afine	—	0,900	—	—	—	—	—	0,090	—	—	15,0
Cireșe	—	0,360	—	—	—	0,060	0,060	0,050	0,100	—	10,0
Coacăze negre	—	0,250	—	—	—	0,050	0,060	—	0,300	—	200,0
Lămîi	—	0,250	—	—	—	0,050	0,030	—	0,300	—	50,0
Măceșe (pulpă)	—	5,000	—	—	—	0,030	—	—	—	—	1000,0
Mere	—	0,050	—	—	—	0,045	0,030	0,250	1,000		5,0
Pepene galben	—	—	—	—	—	0,030	0,020	0,040	—	—	15,0
Pepene roșu	—	0,400	—	—	—	0,030	—	0,040	—	—	5,0
Piersici	—	0,700	—	—	—	0,060	0,070	—	0,900	—	9,0
Portocale	—	0,250	—	—	—	0,060	0,040	0,100	—	—	50,0
Prune	—	0,450	—	—	—	0,120	0,600	0,100	0,300	—	5,0
Struguri	—	0,010	—	—	—	0,050	0,020	0,120	0,400	—	3,0
Nuci	100	0,500	—	—	—	0,550	0,400	0,250	—	—	5,0
Marmelada	—	0,120	—	—	—	0,050	—	—	—	—	9,0

Scanned with OKEN Scanner

a. În reacţiile de oxidoreducere, fundamentale pentru toate celulele, vit. B_2 în flavinenzime; vit. P.P. în piridindehidrogenaze (NAD, NADP); vitaminele E şi K în sistemele chinonice; vit. C în sistemul„ endiol-dioxo" etc.;

b. În metabolismul aminoacizilor, ca parte activă a aminoacid-decarboxilazelor, —desaminazelor, transaminazelor (vit. B_6);

c. În metabolismul fragmentelor „C_1": decarboxilazele α-cetoacizilor (esterii fosforici ai tiaminei), în β-carboxilare (biotina) şi în transferul fragmentelor „C_1": transformilări, transmetilări (vitaminele folinice şi corrinoide) etc.;

d. În transferul fragmentelor „C_2" şi a lanţurilor acil (de exemplu, acizi graşi) sub formă de coenzimă acetilantă „CoA—SH" (cu ac. pantotenic);

e. În cadrul enzimelor hidrolitice, mai puţin cunoscut, ca de exemplu, efectul activator al inozitolului asupra hidrolizei produse de amilaze sau a acidului ascorbic asupra esterazelor;

f. Vitaminele joacă un rol important şi în procesele biochimice dinamice, în interacţiunile dintre metaboliţi şi antimetaboliţi. Relaţia dintre aceştia şi medicamente a fost iniţial demonstrată pentru PAB ($H_2N—C_6H_4—COOH$), cu rol de vitamină şi a cărui efect biologic este inhibat de sulfamide ($H_2N—C_6H_4—SO_2NH_2$) care funcţionează ca antimetaboliţi. Relaţia dintre cei doi parteneri este reciprocă şi competitivă şi depinde, în mare măsură, de concentraţia şi respectiv de activitatea specifică a partenerilor, observîndu-se că efectul terapeutic al sulfamidelor este anulat de către concentraţii mari de PAB *(Woods, Filder, 1940)*. Aceste mecanisme stau la baza dezvoltării chimioterapiei moderne.

În prezent se acordă importanţă *interacţiunilor* dintre *vitamine-vitamine, vitamine-hormoni* şi *vitamine-medicamente,* care se traduc prin efecte de sinergie şi potenţare sau de scădere a acţiunii diferitelor vitamine şi respectiv hormoni sau medicamente. Asupra unor asemenea aspecte şi asupra rolului vitaminelor în sistemele şi procesele biochimice se va reveni în continuare (în capitolele consacrate descrierii vitaminelor, enzimelor şi metabolismelor).

2.1.1.5. *PRINCIPIILE DE DOZARE ALE VITAMINELOR*

Dozarea vitaminelor se impune în domenii diferite: în nutriţie, clinică, industriile de medicamente şi unităţile farmaceutice etc. şi utilizează metode şi tehnici variate, adaptate scopului;

Metode fizice, fizico-chimice şi chimice: spectrele de absorbţie în U.V. sau vizibil; determinarea culorii sau fluorescenţei vitaminelor ca atare sau după tratarea cu diferiţi reactivi; metode polarografice, cromatografice şi titrări uzuale (reacţii de neutralizare, oxido-reducere, argentometrice, în mediu neapos etc.), precum şi alte metode folosite în chimia analitică şi în controlul medicamentelor.

Metodele microbiologice, bazate pe urmărirea dezvoltării unor microorganisme pe medii sintetice, cu adăugarea vitaminei în concentraţii diferite, sînt avantajoase datorită selectivităţii, sensibilităţii şi costului redus.

Testele biologice, efectuate pe animale hrănite cu regim sintetic sau natural, din care s-a eliminat vitamina în cauză, urmăresc efectul preventiv (profilactic) sau curativ (de vindecare a simptomelor carenţei).

Testele clinice, prin care se stabilesc necesităţile pentru prevenirea carenţei (profilactice) sau pentru vindecarea simptomelor caracteristice (curative). Ele servesc de asemenea pentru aprecierea gradului de hipo- sau avitaminoză, prin urmărirea unor semne clinice (adaptarea de la lumină la întuneric pentru vit. A;

Scanned with OKEN Scanner

gradul de anemie şi respectiv tabloul sanguin pentru vitaminele antianemice), precum şi prin urmărirea vitaminemiei şi/sau vitaminuriei, ca atare, sau după administrarea unor cantităţi mari de vitamine („teste de saturare") şi a unor indicatori biochimici vitamino-dependenţi (de exemplu, curba de relaţie a esterilor fosforici ai vit. B_1).

Metodele biochimice urmăresc indicatorii care caracterizează diferitele hipo- sau avitaminoze şi respectiv efectele biochimice ale vitaminelor. Astfel, creşterea fosfatazei alcaline este primul semn care apare în rahitism (înaintea manifestărilor clinice) şi ultimul care dispare (după vindecarea bolii); determinarea unor enzime care au ca parte activă vitaminele (de exemplu, codehidraze, flavinenzime) sau a unor procese biochimice condiţionate de vitamine şi respectiv a unor metaboliţi care prezintă modificări în carenţele vitaminice (de exemplu, creşterea acidului piruvic în creier şi sînge în avitaminoza B_1). Tot din acest domeniu fac parte metodele care urmăresc, prin tehnici diferite, distribuţia vitaminelor în ţesuturi şi umori şi formele active şi de metabolizare şi căile lor de eliminare; prin asemănare cu „farmacocinetica" s-ar putea folosi, în acest caz, termenul de *„vitaminocinetică" (D. Bedeleanu).*

Criteriile principale de decizie în selectarea metodelor de dozare au în vedere cantitatea vitaminei din materialul de analizat, complexitatea produsului şi substanţele care pot interfera, mai numeroase în materialele biologice şi alimente şi mai puţine în preparatele farmaceutice, precum şi specificul şi dotarea laboratorului.

2.1.1.6. *NOMENCLATURA ŞI DEFINIREA UNOR TERMENI*

Noţiunea de *„provitamină"* indică precursori inactivi (exogeni) care se transformă în organism în vitaminele active, cum ar fi 7-dehidrocolesterolul sau ergosterolul care se transformă în vitaminele D_3 şi D_2 prin iradiere în piele sau carotenii (inactivi ca atare) care se transformă în vitamina A sub efectul carotenazelor (din intestin). Rolul de provitamine trebuie privit în raport de specie, deoarece unele animale pot efectua activarea acestora, altele nu.

Alături de vitamine există şi alţi factori *esenţiali*, care se comportă similar vitaminelor, dar care intră în structura celulelor sau servesc ca surse de energie, aşa cum sînt acizii graşi esenţiali (AGE), consideraţi de unii ca vitamina F, sau aminoacizii esenţiali (AAE). Carenţa acestora se aseamănă cu lipsa unor vitamine, dar diferă substanţial, prin cantităţile mult mai mari necesare (de ordinul gramelor/zi, faţă de vitamine: µg sau mg/zi). Asemenea factori esenţiali sînt denumiţi *„vitagene"*.

„Vitamerele" cuprind substanţele naturale sau sintetice înrudite cu vitaminele şi care au acţiune similară cu acestea, de exemplu, ac. pimelic *(figura 2.2)* care poate înlocui biotina ca factor de creştere pentru *Corynebacterium difteriae.*

Unii autori *(Burk, 1944)* includ în această grupă şi formele active ale vitaminelor (amida acidului nicotinic, esterii fosforici ai tiaminei, flavinnucleotidele), provitaminele, formele diferite ale aceleiaşi vitamine, care apar în cursul metabolizării lor (vit. A sub formă de aldehidă şi alcool; vit. B_6 cu grupare $-NH_2$ sau -CHO) etc. Rezultă deci că noţiunea de „vitamere" este destul de imprecisă; în orice caz ea nu trebuie să includă provitaminele, formele active şi cele de metabolizare ale vitaminelor. În consecinţă, dacă termenul de „vita-

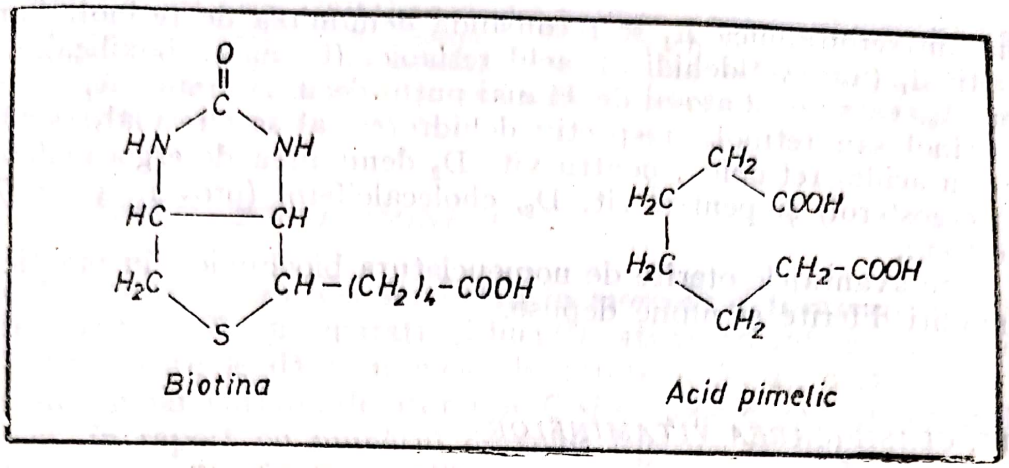


Fig. 2.2. Formulele biotinei şi acidului pimelic

gene" îşi poate găsi o justificare, cel de „vitamere" este inutil şi generator de confuzii.

Sub denumirea de *„antivitamine"* se cuprind compuşii care au acţiune antagonistă vitaminelor şi care produc simptomele carenţei vitaminei respective. Tipul reprezentativ este al *analogilor structurali*, care intră în competiţie cu o vitamină cu care prezintă asemănare structurală, fie în cadrul unui sistem enzimatic (cazul citat al antagonismului PAB-sulfamide), fie prin alte mecanisme.

Alte antivitamine acţionează prin alterarea structurii vitaminei, de exemplu, tiaminaza, care rupe molecula vitaminei B_1, ascorbaza, care are ca substrat vit. C. lipooxidazele, care inactivează provitaminele A; prin „legarea" vitaminelor în complexe inactive, de exemplu avidina (proteină din albuşul de ou nefiert) care inactivează biotina sau penicilinamida şi izoniazida care formează complexe cu vitamina B_6 (piridoxal-fosfat); de asemenea există numeroşi compuşi care reacţionează chimic cu vitaminele sau care inhibă biosinteza acestora (de exemplu, 1, 2-diclor- şi 1,2-dibrom-4,5-diaminobenzolii acţionează ca inhibitori ai sintezei vit. B_{12}).

Mecanismul de acţiune al antivitaminelor este valorificat în terapie (în chimioterapie, medicaţia cu anticoagulante; antivitamine K etc.) şi serveşte în cercetările experimentale pentru realizarea avitaminozelor pure (de exemplu, avitaminoza B_1 prin tiaminază).

Denumirea vitaminelor implică criterii diferite:

a. Pe baza acţiunii fiziologice, respectiv a bolilor carenţiale, de exemplu, vitamina antirahitică, antiscorbutică, antipelagroasă, antianemică etc..

b. În ordinea descoperirii cronologice folosind literele mari ale alfabetului: vitaminele A, B, C, D, E etc.; uneori literele se referă, convenţional, la unele proprietăţi ale vitaminelor, de exemplu, vit K de la „Koagulation", vit. H, de la „Haut" (= piele), vit P.P. de la „Pelagre preventing". Cu progresul realizat în izolarea şi caracterizarea vitaminelor, în cadrul aceleiaşi litere s-au identificat factori diferiţi, notaţi prin indici numerici, de exemplu, vit. A_1, A_2, A_3, D_{2-6} B_{1-15}, K_{1-7} sau chiar subgrupe în cadrul aceluiaşi indice numeric, notate cu literele mici ale alfabetului: vit. B_{12a}, B_{12b}, B_{12c}.

c. Denumiri de compromis între denumirea chimică şi fiziologică: axeroftol, aneurina, tocoferoli etc.

d. Comisiile de nomenclatură biochimică au preconizat reguli raţionale pentru denumirea vitaminelor pe baza structurii lor chimice, de exemplu, pentru

vitamina antixeroftalmică A_1 se recomandă denumirea de retinol$_1$ (forma alcoolică), retinal$_1$ (forma aldehidică), acid retinoic$_1$ (forma carboxilică), iar pentru vitamina A_2, care are 2 atomi de H mai puţin decît vitamina A_1 denumirile de dehidroretinol sau retinol$_2$, respectiv dehidroretinal sau retinal$_2$, acid dehidroretinoic sau acidul retinoic$_2$; pentru vit. D_2 denumirea de ergocalciferol (provenită din ergosterol) şi pentru vit. D_3, cholecalciferol (provenită din 7-dehidrocolesterol) etc.

Cu toate avantajele oferite de nomenclatura biochimică, în practică persistă încă denumiri diferite şi nume depuse.

2.1.1.7. *CLASIFICAREA VITAMINELOR*

Gruparea vitaminelor în *liposolubile* şi *hidrosolubile (Osborne, Mendel, 1915)* are la bază un criteriu obiectiv, solubilitatea lor în lipide şi solvenţii organici şi respectiv în apă şi solvenţii polari, care se corelează şi cu unele caracteristici fiziologice, deoarece vitaminele liposolubile se absorb din tractul digestiv după tipul absorbţiei lipidelor (necesită prezenţa bilei, emulsionarea etc.), iar cele hidrosolubile, prin alte mecanisme. Cu toate că acestei clasificări i se aduc critici legate de existenţa unor vitamine care sînt practic insolubile atît în solvenţii organici cît şi în cei polari şi/sau că arsenalul terapeutic dispune în prezent de vitamine sintetice şi de derivaţi cu solubilitate diferită de a vitaminelor naturale (de exemplu vitaminele K naturale sînt liposolubile, cele sintetice, hidrosolubile sau formele liposolubile ale vitaminelor naturale hidrosolubile, cum ar fi în cazul unor derivaţi ai vit. B_1), totuşi această clasificare se menţine ca foarte utilă pentru practica medico-farmaceutică.

În cadrul *vitaminelor liposolubile* sînt cuprinse vitaminele A, D, E, K, F, iar în cele *hidrosolubile*, grupul B şi C; din primul grup fac parte vitaminele B_1, B_2, vitaminele dermotrope sau antipelagroase (P.P. pentru om, B_6 pentru şobolani, acidul pantotenic pentru păsări), vitaminele antianemice (grupul acidului folic şi folinic, vit. B_{12}), factorul „Bios" (de creştere a microorganismelor, de exemplu, biotina, PAB); din grupul vitaminelor C fac parte acidul ascorbic (vit. C) şi bioflavonoidele (vit. P sau C_2).

2.1.I. VITAMINELE LIPOSOLUBILE

2.1.2. RETINOLII, PROVITAMINELE ŞI VITAMINELE A

Boala *„hikan"* descrisă la copiii din Extremul Orient, caracterizată prin umflarea progresivă a pleoapelor, imposibilitatea de a deschide ochii, opacefierea corneei şi umplerea ochilor cu un lichid purulent (suprainfecţii) ce duc final la orbire a fost atribuită unor cauze alimentare *(Makenzie, 1857)*; în timpul primului război mondial boala s-a înregistrat şi la copiii din Danemarca hrăniţi cu lapte smîntînit (din cauza exportării untului). În prezent se cunoaşte sub denumirea de *xeroftalmie*, ca o avitaminoză A.

Factorul alimentar deficitar, capabil să protejeze şi să vindece unele simptome ale bolii a fost izolat din extractele lipidice şi denumit „factor de creştere A liposolubil" *(Mc. Collum, M. Davis, 1914)* şi respectiv *vitamina A (Drummond, 1916)*; după stabilirea structurii s-a realizat sinteza *(P. Karrer, 1931* şi respectiv, *1937)*. În paralel au fost izolaţi prin cromatografie pe coloană *carotenii (Twet, 1911)*, s-a recunoscut rolul de provitamine al acestora *[H. Steenbock, P. W. Boutwel (1920)*;

Th. Moore (1930); H. von Euler (1938)], s-a stabilit structura β-carotenului şi sinteza acestuia [*G. MacKinney (1952); A. E. Purcell G. A. Thompson, J. Bonner (1959)*].

Omul şi unele specii animale nu pot sintetiza vitamina A, dar pot transforma unii caroteni provitaminici în vitamina activă; necesităţile sînt astfel asigurate prin aportul de provitamine, din plante şi de vitamine elaborate, din regnul animal..

2.1.2.1. *CAROTENII: PROVITAMINE A*

Pigmenţii carotenici au fost semnalaţi în morcovi şi frunze [*H. Wackenroder (1831), Berzelius (1837)* şi separaţi, şi identificaţi pe colană de către botanistul rus *Ţwet (1911)* care le dă şi numele de caroteni. Ei au o structură poliizoprenică, cu un număr variabil de atomi de C şi o culoare galben-portocalie, pînă la roşu-violet, în raport cu numărul dublelor legături conjugate.

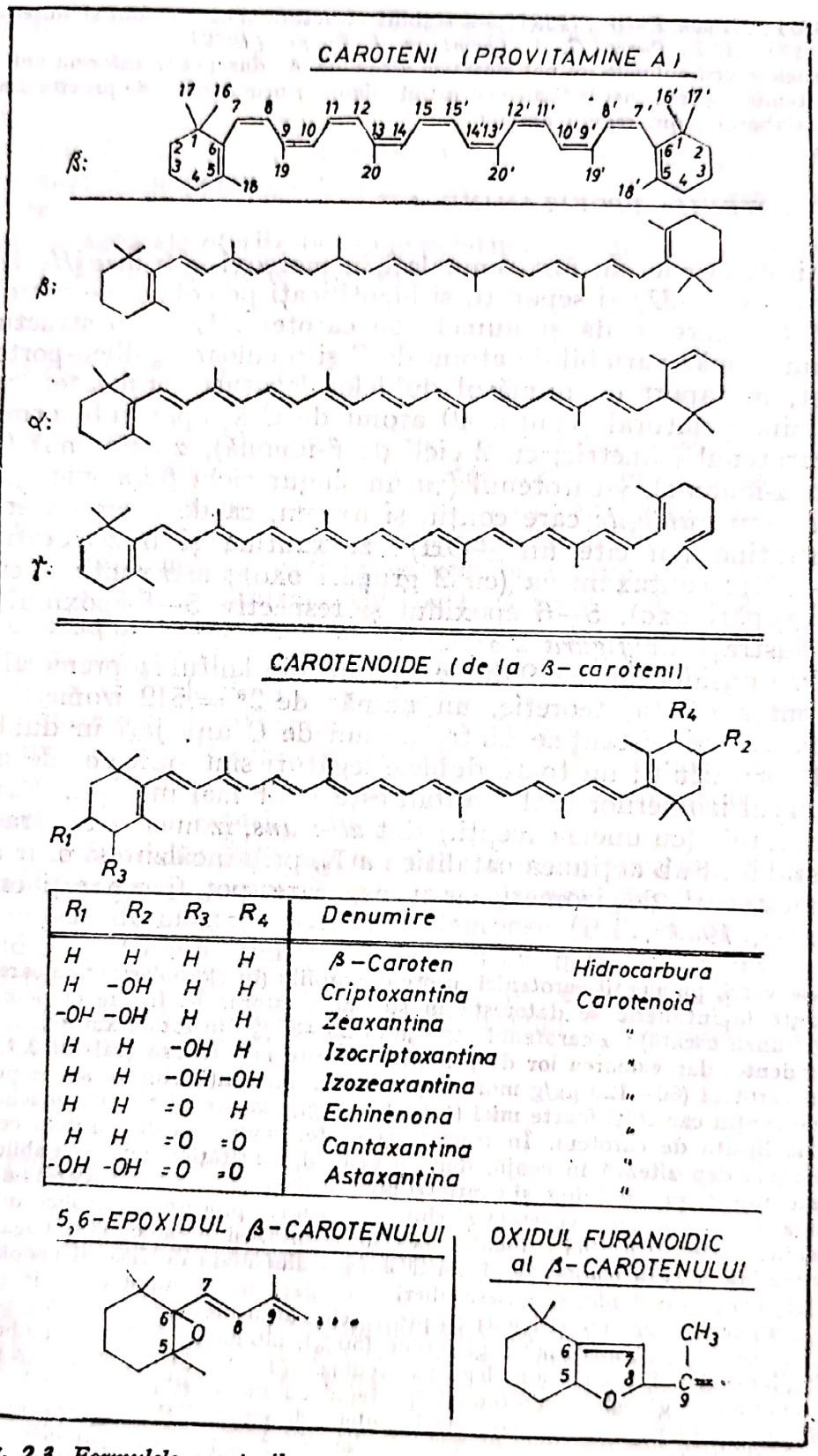
Provitaminele naturale conţin 40 atomi de C şi apar sub formă de *hidrocarburi*: β-carotenul (simetric, cu 2 cicli de β-iononă), α-carotenul (cu un ciclu β şi un ciclu α-ononic), γ-carotenul (cu un singur ciclu β-ononic) şi sub formă de *carotinoide* sau *xantofile* care conţin şi oxigen, ca de exemplu criptoxantina şi izocriptoxantina (cu cîte un —OH); zeaxantina şi izozeaxantina (cu cîte 2 grupări —OH); cantaxantina (cu 2 grupări oxo); astaxantina (cu 2 grupări —OH şi 2 grupări oxo), 5—6 epoxidul şi respectiv 5—8-epoxidul sau oxidul furanoidic, ilustraţi în *figura 2.3*

Izomerie. Considerînd cele 9 duble legături din lanţul izoprenic al α şi β-carotenilor, ar putea exista, teoretic, un număr de $2^9 = 512$ izomeri „cis- trans", dar, avînd în vedere distanţele dintre atomii de C angajaţi în dublele legături şi H şi $-CH_3$ subtituiţi, nu toate dublele legături sînt suficient de active steric şi astfel numărul izomerilor reali posibili este mult mai mic *(L. Pauling)*. Provitaminele naturale (cu unele excepţii) sînt *all-trans*, izomeri mai săraci în energie şi deci mai stabili. Sub acţiunea catalitică a I_2, prin încălzire şi prin alte metode se obţin amestecuri de izomeri cis-trans, care pot fi separaţi cromatografic *(L. Zechmeister, 1944)*.

În plantele verzi, pigmenţii carotenici însoţesc clorofila (în cloroplaste); culoarea galben-brună a plantelor ţinute la întuneric se datoreşte în special acestora. În frunze predomină β-carotenul (200—700 μg/g frunză uscată); α-carotenul reprezintă 25—35% din total; xantofilele (carotenoidele) pot fi mai abundente, dar valoarea lor de provitamine este mai redusă *(tabelul 2.3)*. Morcovii sînt foarte bogaţi în caroteni (60—120 μg/g morcov proaspăt), dar conţinutul lor scade prin păstrare şi uscare; cerealele conţin cantităţi foarte mici (1,3—1,5 μg/g), care se pierd prin măcinare, încît făina albă este practic lipsită de caroteni. În fructele colorate, cantitatea de caroteni creşte pe măsură ce acestea se coc şi se depozitează în coajă, dar, în general, cantităţile sînt neglijabile. Algele conţin fucoxantină, care nu este provitamină, şi cantităţi mici de α şi β - caroteni. Carotenii şi carotenoizii din regnul animal sînt de origine vegetală şi sînt supuşi unor procese metabolice în absorbţie şi în organism, devenind astfel „specifici". Ficatul peştilor marini şi oceanici este bogat în caroteni şi în special în vitamină A gata elaborată, datorită consumului mare de fito- şi zooplancton. În produşii naturali, pigmenţii carotenici se găsesc liberi sau legaţi, de exemplu, esterificaţi cu acizii graşi (ac. palmitic), eterificaţi cu glucide şi legaţi cu proteinele; afinitatea carotenoizilor pentru proteinele plasmatice umane se situează în seria: β-globuline (50%), albumine (20%). α_2-globuline (10%), α_1-globuline (6,7%), iar γ-globulinele par a nu lega carotenoizii *(E. M. Crook, M. K. El-Marsafy, 1954)*; în carapacea homarilor se găseşte o carotenoido-proteidă cu astaxantină.

Sursa principală sînt plantele: lucerna, iarba, uleiul de palmier şi în special morcovii. Prezenţa apei deranjează extracţia şi de aceea se elimină prin uscare rapidă pe Na_2SO_4 anhidru, Na_2CO_3 anhidru, alcool (uscarea simplă îi distruge); balastul lipidic se îndepărtează prin saponificare şi carotenii, din partea insaponificabilă, se extrag cu solvenţi organici. În practică, se adsorb carotenii din sucul de morcovi pe $Mg(OH)_2$ de unde se extrag cu eter (metoda *Balahovski*) sau se extrag morcovii fierţi şi uscaţi rapid cu solvenţi organici *(Racevski)*, preferîndu-se tetrahidrofuranul, neinflamabil *(H. J. Bielig, 1944)*. Carotenii pot fi obţinuţi şi prin sinteză industrială *(P. Karrer; O. H. Isler şi colab. 1957)*

Scanned with OKEN Scanner



R_1	R_2	R_3	R_4	Denumire	
H	H	H	H	β-Caroten	Hidrocarbura
H	-OH	H	H	Criptoxantina	Carotenoid
-OH	-OH	H	H	Zeaxantina	"
H	H	-OH	H	Izocriptoxantina	"
H	H	-OH	-OH	Izozeaxantina	"
H	H	=O	H	Echinenona	"
H	H	=O	=O	Cantaxantina	"
-OH	-OH	=O	=O	Astaxantina	"

Fig. 2.3. Formulele carotenilor, carotenoidelor (de la β-caroten) și a unor derivați biologic activi.

Proprietăți fizico-chimice. *α-carotenul* cristalizează din benzen/metanol în prisme ascuțite roșii-violete cu luciu cupros (p.t. 187—188°); dizolvat în S_2C prezintă o culoare roșie, în cloroform, galben-brună, iar în eter de petrol, galben-verde. *β-carotenul* cristalizează din benzen/metanol în prisme de culoare violet închisă, iar din eter de petrol, ca plăcuțe cu luciu metalic (p.t. 183°). *γ-carotenul* apare sub formă de snopi de ace (p.t. 178°). În mediu de etoxid de Na, α-carotenul se transformă în forma β. Dintre carotenoide prezintă interes criptoxantina (p.t. 169°) și în special zeaxantina (p.t. 215°), care alături de β caroten sînt cele mai răspîndite provitamine A (în porumb, frunze, fructe, legume).

Carotenii sînt foarte sensibili la acizi și O_2 care îi distrug. Prin autooxidare se transformă în produși incolori; s-au identificat intermediari cu catena nedegradată (de exemplu derivați hidroxilici și epoxizi) și produși de degradare de tipul carotenalilor. Hidroperoxidul de tetralină oxidează ciclul β-ononic cu formarea 4-hidroxi- și apoi a 4-oxo-derivaților. Epoxizii pot ceda oxigenul unui acceptor, de exemplu, acid ascorbic, jucînd astfel un rol în procesele de oxidoreducere celulară *(C. Bodea și colab.)*.

Dozarea carotenilor se efectuează, după extragerea și purificarea lor, prin fotocolorimetrie (la 440 nm) sau prin urmărirea efectului de vitamină A (vezi 2.1.2.2).

2.1.2.1.1. CONDIȚII DE PROVITAMINĂ. TRANSFORMAREA ÎN VITAMINA A

Pentru a servi ca provitamine, carotenii trebuie să îndeplinească anumite condiții: *a.* să conțină cel puțin un ciclu β-ononic nesubstituit (cu unele excepții care rezultă din *tabelul 2.3*); β-carotenul avînd molecula simetrică se transformă, teoretic, în 2 molecule de vitamină A, ceilalți într-o singură moleculă; *b.* să respecte caracteristicile lanțului poliizoprenic; alterarea succesiunii dublelor legături sau scurtarea lanțului, în partea identică cu jumătate din β-caroten anulează proprietățile de provitamină; *c.* să se găsească în conformația all-trans (naturală), excepție făcînd, de exemplu γ-carotenul, care deși este cis, este provitamină; *d.* bioechivalența în acțiunea de vitamină A diferă după natura moleculei *(tabelul 2.3)*

Transformarea carotenilor în vitamină A are loc sub influența *carotenazei* (carotenoxigenazei) din peretele intestinal *(D. S. Goodman și colab., 1967)* și/sau ficat, probabil în dependență de specie; la om, în intestin.

Ca mecanism de acțiune al carotenazei s-a propus o hidroliză:

1 mol. β-caroten + 2 mol. apă = 2 mol. retinol (vitamina A)

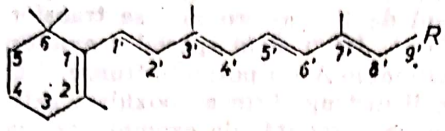
implicînd o echivalență între 1 mol. β-caroten și 2 mol de vitamină A, ceea ce nu corespunde realității *(Mead)* și, în consecință, se sugerează un alt mecanism: oxidarea dublei legături centrale, cu formarea în prima fază a retinalului (aldehidă) și reducerea acestuia la retinol *(Hunter)*, mecanism susținut și de transformarea chimică a carotenilor în vitamina A, după reacțiile:

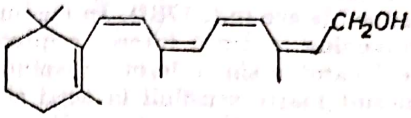
$$R{-}CH{=}CH{-}R \xrightarrow{\text{oxid.}} R{-}CHO + OHC{-}R \xrightarrow{\text{red.}} R{-}CH_2OH + HOH_2C{-}R$$

2.1.2.2. *RETINOLII. VITAMINELE A. VITAMINA ANTIXEROFTALMICĂ. AXEROFTOLII.*

Structura. Vitamina A_1 se găsește sub mai multe forme: cu grupare alcoolică primară, *retinolul*$_1$ sau *axeroftol*, care se poate transforma în aldehidă, *retinal*$_1$ sau *retinen*$_1$, de asemenea activ și în *acidul retinoic*$_1$, eficient în creștere, dar nu în vedere și reproducere (probabil metabolit), *Vitamina* A_2 are o dublă legătură în plus în ciclu și apare în aceleași forme ca și vitamina A_1, adică *retinol*$_2$ sau *dehidroretinol*, *retinal*$_2$ și respectiv *acidul retinoic*$_2$. *Vitamina* A_3 prezintă o migrare a ultimei duble legături spre gruparea metil adiacentă *(figura 2.4)*.

VITAMINA A_1

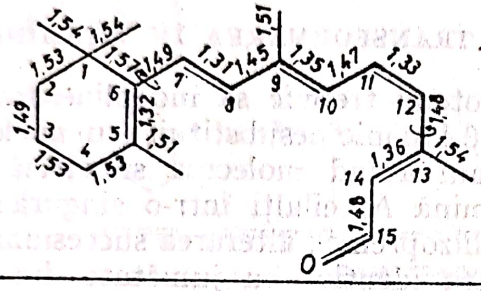




$R = -CH_2OH$: Vitamina A_1 = Retinol$_1$ = Axeroftol$_1$
2,6,6-trimetil-1-(9'-hidroxi-3',7'-dimetilnona-1',3',5',7'-tetrâ-enil)-ciclohexa-1-en

$R = -CHO$: Aldehida vitaminei A_1 = Retinal$_1$ = Retinen$_1$

$R = -COOH$: Acidul vitaminei A_1 = Acidul retinoic$_1$

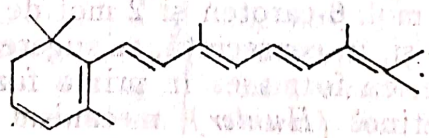


Neoretinal$_1$ (în Å)

IZOMERII VITAMINEI A_1

1) $\Delta_{7,9,11,13}$-trans-retinol : alltrans-retinol
2) Δ_{13}-cis-$\Delta_{7,9,11}$-trans : neo-retinol
3) Δ_{9}-cis-$\Delta_{7,11,13}$-trans : retinol de sinteză
4) $\Delta_{9,13}$-cis-$\Delta_{7,11}$-trans : retinol de sinteză

VITAMINA A_2



$R = -CH_2OH$: Vitamina A_2 = Retinol$_2$ = Dehidroretinol
••••••• -ciclo-hex-1,3-diena (vezi vitamina A_1)

$R = -CHO$: Dehidroretinal = Retinal$_2$ = Retinen$_2$

$R = -COOH$: Acid 3-dehidroretinoic = Acid.retinoic$_2$

VITAMINA A_3

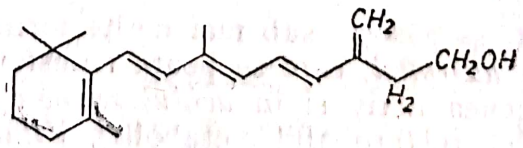


Fig. 2.4. Structura, formulele și denumirile vitaminelor A

Cele 4 duble legături din lanțul lateral al vitaminelor A se pot nota diferit: prin desemnarea primului atom de C din lanț cu 1 sau 1'; prin notarea celor 6 atomi de C din ciclu cu 1—6 și a primului din lanț cu 7 sau notînd dubla legătură din ciclu cu 1 și prima din lanț cu 2 etc.

Datorită dublelor legături din lanț se cunosc următorii izomeri:

1) $\Delta_{7,9,11,13}$-trans: retinol all-trans (65% din vit. A)
2) Δ_{13}cis, $\Delta_{7,9,11}$-trans: neoretinol (natural)
3) $\Delta_{9,13}$cis, $\Delta_{7,11}$-trans: retinol de sinteză
4) Δ_{9}cis, $\Delta_{7,11,13}$-trans: retinol de sinteză

Cînd toate dublele legături sînt în trans se folosește denumirea de „all-trans" sau „total trans", iar cînd dubla legătură terminală se găsește în cis se utilizează prefixul „neo-".

Vitamina A se poate obține pe căi diferite: ***a. din caroteni:*** prin ruperea oxidativă a β-carotenului cu H_2O_2/OsO_4, cînd se obține retinalul, care prin reducere se transformă în retinol$_1$, cu un randament de 30—40% *(Wendler, 1950)*; ***b. din uleiul de ficat de pește*** (untură pe pește), obținut prin antrenarea cu vapori de apă a ficatului unor pești *(Gadua morhua)* și purificare ulterioară. Din acest material se izolează vitamina A prin extragere cu eter de petrol, saponificare cu KOH alcoolic în atmosferă de N_2 (îndepărtarea lipidelor de balast), urmată de cromatografierea sau distilarea în vid a insaponificabilului; *c. prin sinteză*, cu ajutorul unor metode care se pot aplica în laborator sau industrial *(figura 2.5)*.

Retinolul cristalizează din metanol sub forma unor plăci cu p.t. 8° (care conțin metanol inclus) și care se prezintă la t° camerei ca un ulei vîscos, optic activ; din formiat de etil sau propilen sau prin distilare moleculară se obține un produs mai pur, cu p.t. 63—65°. Neoretinolul are p.t. 58—60°.

Vitaminele A sînt insolubile în apă și ușor solubile în grăsimi, uleiuri și solvenții organici uzuali. Vitamina A este foarte ușor alterabilă: afectarea dublelor legături (oxidare, halogenare, hidrogenare) o distrug; încălzirea favorizează degradarea în aer (barbotarea aerului încălzit la 120° distruge în 14 ore toată vitamina), în schimb vitamina rezistă la încălzire la 130° în lipsa aerului. Substanțele cu potențial oxidant: O_3, peroxizi, uleiuri rîncezite, $FeCl_3$ o distrug rapid. Razele X, UV și în general conservarea la lumină produce degradarea pînă la β-iononă (inactivă), care se recunoaște prin mirosul de violete. Pentru evitarea inactivării este necesară protejarea vitaminei A în preparatele farmaceutice prin adăugarea unor substanțe „antioxigen" de exemplu, tocoferoli, hidrochinonă, chinhidronă; în scop industrial se recurge la filtrarea prin grăunțe de ovăz decorticat, care conțin substanțe antioxigen capabile să protejeze vitamina A.

Vitamina A_2, 3-dehidroretinolul sau *retinolul$_2$* a fost izolată inițial din ficatul peștilor de apă dulce sub forma unui ulei galben-portocaliu și ulterior cristalizată.

Retinalul$_1$, aldehida vitaminei A_1 s-a obținut din pielea unor broaște *(Rana pipiens, Rana esculenta)* și din retină *(G. Wald)*. La fel cu forma alcoolică prezintă izomeri diferiți: all-trans-retinal; neoretinal *a* (13 cis), *b* (11-cis), *c* (11, 13-di-cis), izoretinal *a* (9-cis) și *b* (9, 13-di-cis).

În *scopuri farmaceutice* se utilizează în special compușii în care gruparea alcoolică a vitaminei A_1 este esterificată cu acetat sau palmitat.

Acetatul de retinol (Retinoli acetas, F.R. IX) se prezintă ca o soluție uleioasă sau amestec de ulei și cristale, de culoare galbenă, pînă la galben-portocalie, cu miros și gust caracteristic, dar fără miros rînced; sensibil la lumină.

Este insolubil în apă și solubil în etanol anhidru, uleiuri vegetale, oleat de etil, cloroform.

Soluțiile uleioase sînt stabile la căldură, dacă uleiul nu conține peroxizi; pentru dizolvare și omogenizare, recipientul închis se încălzește, pînă la 60°C pe baia de apă și se agită. Stabilitatea

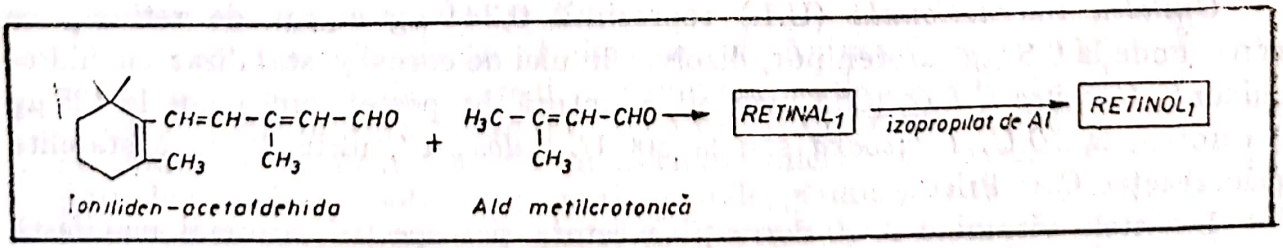


Fig. 2.5. Sinteza parțială a vitaminei A

în soluție de ulei de parafină, de arahide sau în oleat de etil crește prin adăugarea de 0,05% galat de propil, hidrochinonă sau alfa-tocoferol; stabilitatea comprimatelor scade prin creșterea umidității.

Prezintă *incompatibilități* cu oxidanții, uleiurile rîncede, eteroleul de lămîie și guma arabică, deoarece acestea conțin peroxizi; cu caolin (se absoarbe și nu este cedat în tractul gastrointestinal); de asemenea uleiul de parafină împiedică absorbția intestinală. Se va evita prelucrarea sub formă de emulsie, deoarece în această stare de diviziune manifestă o mare suprafață susceptibilă oxidării.

Palmitatul de retinol (Retinolii palmitas) manifestă proprietăți similare acetatului. Se pot obține soluții apoase cu ajutorul agenților de solubilizare de tipul polisorbat 80 sau Cromofor R., care însă nu suportă încălzirea în vederea sterilizării și necesită adăugarea unor antioxidanți, de exemplu alfa-tocoferol 3%, acid ascorbic 0,1%, acid nordihidroguaiaretic 0,01% sau EDTA-Na_2 0,20% *(L. Klotz, 1964)*.

Dispersia de vitamină A palmitat conține un amestec de glicerol sau propilenglicol și un tensioactiv de tipul polisorbaților pentru dizolvarea vitaminei; la diluare cu apă formează soluții limpezi, ușor resorbabile oral, parenteral sau din preparatele cu unt de cacao sau Witespo H 15 cu p.t. scăzut *(din V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Dozarea se face prin metode:

Fizice: absorbția la 328 nm; fluorescența verde a vit. A_1 și roșie a vit. A_2 (metode fluorimetrice).

Reacții de culoare: cu H_2SO_4 (culoare albastră); soluția cloroformică de vit. A cu acid tricloracetic (culoare galben-albastră); cu $AsCl_3$ (culoare roșie ce virează rapid la albastru). Cea mai utilizată este reacția *Carr-Price:* soluția cloroformică a vitaminei A se tratează cu soluție cloroformică de $SbCl_3$ cînd se formează o colorație albastră intensă, ce se compară cu o soluție cunoscută de vit. A sau cu o soluție etalon formată din sulfat și azotat de cupru. Acizii grași interferează în aceste reacții și de aceea este necesară îndepărtarea lor (de exemplu, prin saponificare sau cromatografiere).

Teste biologice, de exemplu, testul *colpokeratozei* în care se urmărește apariția unor celule cheratinizate în secrețiile vaginale ale șobolancelor carențate (pentru o observație mai precisă se pot colora cu albastru de metil 1% și acid acetic 3%). În testul *xeroftalmiei* se apreciază alterările oculare apărute în cursul avitaminozei.

Testele clinice urmăresc indicatori diferiți la om:

— adaptarea de la lumină la întuneric: persoana este expusă unei lumini puternice (care îi dă senzația de „orbire") după care este pusă în situația de a distinge obiecte slab luminate (la întuneric). Cu ajutorul unor aparate denumite „adaptometre" se poate înregistra o „curbă de adaptare" din care se deduce gradul de hipovitaminoză, dacă se elimină alte cauze de neadaptare vizuală (tulburări de vedere, oboseală, lipsa de somn, vîrsta înaintată etc.). O metodă simplă situează pacientul 30′ în obscuritate, după care se proiectează pe un ecran opac o fantă de lumină difuză (reglată cu ajutorul unei diafragme gradate) și se înregistrează cea mai slabă strălucire percepută (apreciată prin cifrele care indică deschiderea diafragmei).

— determinarea vitaminei A din sînge: Valori normale: 130 U.I./100 ml plasmă; sub 70 U.I. indică un nivel la limita inferioară a normalității iar sub 50 U.I. o stare de hipo- sau avitaminoză. — testul hipervitaminemiei provocate („curba de încărcare"): se administrează *per os* o doză de 200.000 sau 500.000 U.I. vitamină A în soluție uleioasă și se determină vitaminemia A, înainte și la 4 și 6 ore după administrare. Curba normală prezintă o ascensiune progresivă de la 3 pînă la 6 ore, cînd prezintă valoarea maximă de 500 sau 500 — 1.000 U.I./100 ml sînge (după doza administrată) și revine la valoarea inițială după 24 h. Sub aceste valori se înregistrează o curbă „decapitată". O vitaminemie inițial scăzută cu o curbă decapitată indică tulburări de absorbție; o valoare scăzută, cu o curbă de încărcare normală orientează spre o insuficiență de aport sau spre o utilizare excesivă (necesități crescute); curbe anormal de ridicate se înregistrează în cazul unor tulburări endocrine și în nefroza lipoidică *(H. Grounelle, C. Marnay, 1965)*.

Unitatea internațională (U.I.) reprezintă 0,344 μg acetat de $retinol_1$, ce corespunde la 0,6 μg caroten pur, dizolvat în ulei de cocos și stabilizat cu hidrochinonă. *Unitatea C.L.O.* (Cod liver oil = untură de pește) corespunde la 125 μg β-caroten, la *10 U. Loviboond* sau la 500 U. *„albastre"*, ultimele două stabilite prin reacția Carr-Price.

Diferitele vitamine A și derivații acestora și respectiv carotenii manifestă activități („bioechivalență în vitamină A") diferite (tabelul 2.3).

TABELUL 2.3

Activitatea vitaminică şi biocchivalenţa în vitamină A

CAROTENI	*Biocchivalenţa* (%)	*Conversia în vitamina A a carotenului*	
		Specie	(μg/U.I.)
β-all-trans	*100* (etalon)	Şobolan	0,6
β-mono-cis (neo)	38	Pui	1,0
α-all-trans	53	Porc	1,8
α-mono-cis	13	Ovine	1,8—2,4
γ-all-trans	42	Câine	1,0
γ-mono-cis	19	Cal	3,6
Criptoxantina-all-trans	57		
— mono-cis	27		
Xantofile	0		
Licopen	0		

VITAMINA A ŞI DERIVAŢI		Activitate	
		(U.I./g)	(μg/U.I.)
Retinol (vitamina A-alcool)	115	3.330.000	0,30
Retinol-acetat: — all-trans	*100* (etalon)	2.904.000	0,34
— 13-cis (neoA)	75	2.190.000	
— 9-cis	21	607.000	
— 9,13-di-cis	24	688.000	
— 11-cis	24	690.000	
— 11,13-di-cis	15	428.000	
Retinol-palmitat	63	1.817.000	0,55
Acid retinoic (metil-ester)	100		
5,6-epoxi-retinol	108		
5,8-epoxi-retinal	60		
Acid metil-5,8-epoxi-retinoic	80		

2.1.2.2.1. METABOLISMUL PROVITAMINELOR ŞI VITAMINELOR A

Sursa primară a vitaminei A este reprezentată de carotenii din plante.

Biogeneza carotenilor pleacă de la fragmentele „C_2 active" („acetil-coenzima A") *(F. Lynen, 1960)* şi trece printr-o serie de intermediari, comuni cu cei din biosinteza sterinelor, ca de exemplu, acidul β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA, acidul mevalonic (MVA), mevalonpirofosfat, izopentenil-5-PP, dimetilalil-PP, geranil-PP, farnezil-PP. De aici căile se despart: spre plastochinone, ubichinone şi respectiv spre scualen şi de aici la colesterol şi în continuare la hormonii steroizi şi la vitaminele D, iar prin intermediul geranil-geranil-pirofosfatului spre *caroteni (figura 2.6A şi B)*

Absorbţia provitaminelor şi vitaminei A. Animalele se comportă diferit faţă de aportul alimentar de caroteni, de exemplu, vacile acumulează selectiv carotenii şi exclud xantofilele; maimuţa, broasca, transformă o parte din caroteni în vitamină în ficat; altele în „macrocelulele" mucoasei intestinale şi mai puţin în ficat (omul, şobolanii, iepurii, caprele, găinile şi alte animale). La nivelul intestinului subţire are loc absorbţia carotenilor, a vit. A, ca atare, a celei formată prin transformarea provitaminelor şi convertirea formelor *cis* în *trans*.

Scanned with OKEN Scanner

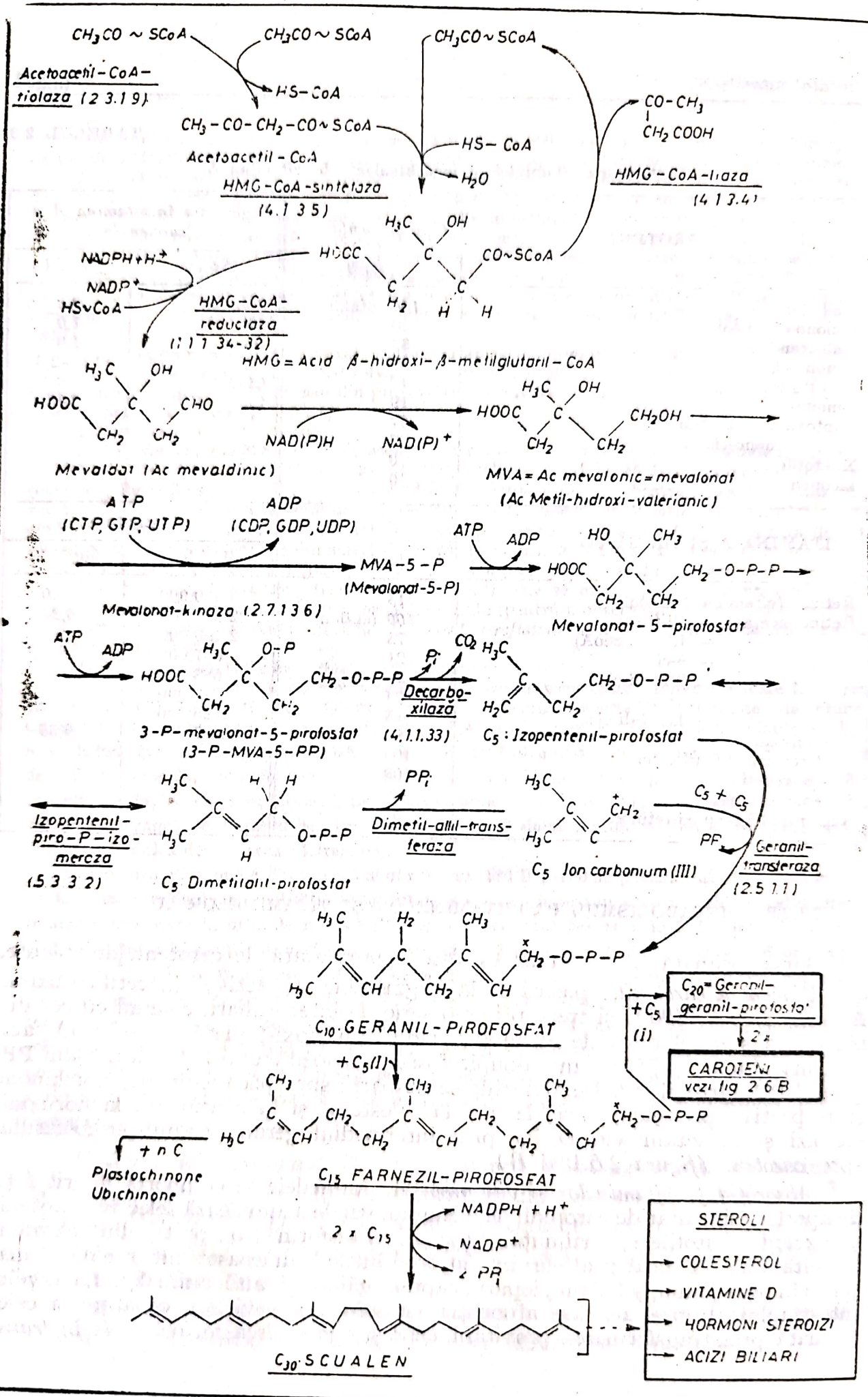


Fig. 2.6. A. Căile comune de biosinteză ale carotenilor, colesterolului, vitaminelor D și a unor compuși înrudiți

Scanned with OKEN Scanner

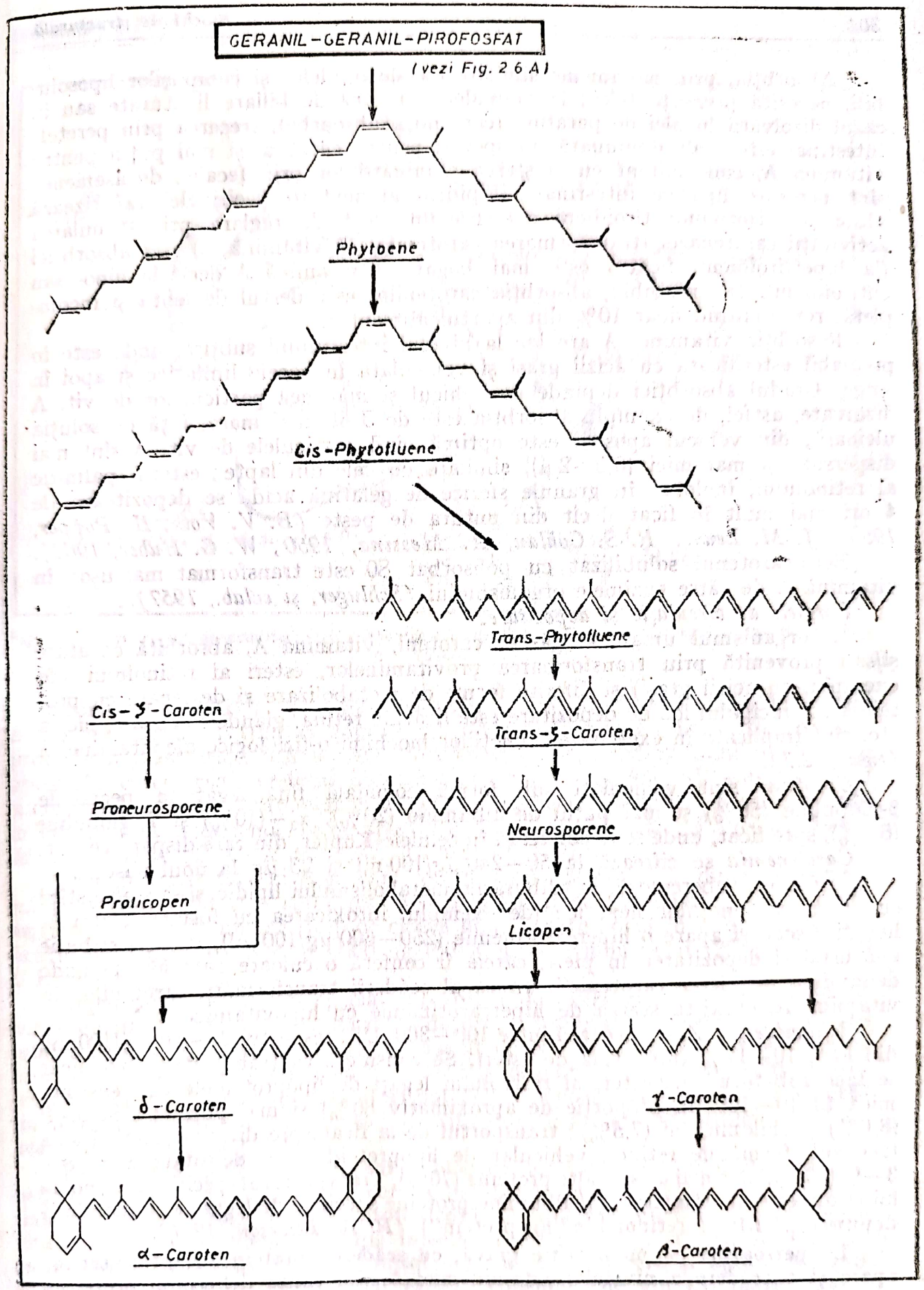


Fig. 2.6. B. Biosinteza carotenilor la tomate (după E. D. Beytix, J. W. Porter, 1976).

Absorbţia, prin mecanisme similare cu ale lipidelor şi compuşilor liposolubili, necesită prezenţa bilei; la animalele cu canalele biliare ligaturate sau în cazul dizolvării în ulei de parafină (care nu se absoarbe), trecerea prin peretele intestinal este mult diminuată, în special pentru caroteni şi mai puţin pentru vitamina A, concomitent cu creşterea eliminării lor prin fecale; de asemenea sînt necesare lipazele intestinale. Lipidele alimentare (lecitinele) favorizează absorbţia. Hormonii tiroidieni exercită un efect de reglare, prin stimularea activităţii carotenazei (transformarea carotenilor în vitamină A) şi a absorbţiei (la hipertiroidieni, ficatul este mai bogat în vitamină A decît la hipo- sau eutiroidieni). În ansamblu, absorbţia carotenilor este destul de lentă şi incompletă, reprezentînd doar 10% din aportul alimentar.

Resorbţia vitaminei A are loc la nivelul intestinului subţire, unde este în prealabil esterificată cu acizii graşi şi vehiculată în vasele limfatice şi apoi în sînge. Gradul absorbţiei depinde de vehicul şi mărimea particulelor de vit. A dizolvate, astfel, de exemplu absorbţia este de 3 ori mai mare, faţă de soluţia uleioasă, din vehicul apos şi este optimă cînd particulele de vit. A sînt mai dispersate şi mai mici (0,5—2 μ), similare cu cele din lapte; esterul palmitic al retinolului, înglobat în granule sferice de gelatină acidă se depozitează de 4 ori mai mult în ficat decît din untura de peşte *(B. V. Volk, H. Popper, 1950; J. M. Lewis, R. S. Cohlan, A. Messina, 1950; W. G. Huber, 1962)*.

Beta-carotenul solubilizat cu polisorbat 80 este transformat mai uşor în vitamină A de către enzimele organismului *(Schluger, şi colab., 1957)*.

Formele de circulaţie şi depozitare.

În organismul uman se găsesc caroteni, vitamina A, absorbită ca atare şi/sau provenită prin transformarea provitaminelor, esteri ai retinolului (de exemplu, cu acizii graşi) şi diferite forme de metabolizare şi de legare cu proteinele. Principalul loc de depozitare este ficatul; retina, glandele sexuale, pielea etc. sînt implicate în exercitarea funcţiilor biochimico-fiziologice ale vitaminei A *(figura 2.7)*.

Carotenii sînt vehiculaţi sub formă coloidală fină, legaţi în special de β-globuline (50%) şi mai puţin de albumine (20%), α_2—(10%) şi α_1-globuline (6,7%), spre ficat, unde se depozitează în celulele Kupfer, din care dispar treptat.

Carotinemia se cifrează la 50—240 μg/100 ml şi 23 μg la noul născut.

În diabet, tuberculoză, în tulburările metabolismului lipidic şi/sau alte stări cu afectarea funcţiilor hepatice (de exemplu, intoxicarea cu fosfor), rezervele hepatice scad şi apare o hipercarotinemie (250—600 μg/100 ml), cu o distribuţie anormală şi depozitarea în piele, căreia îi conferă o culoare galbenă, de unde denumirea de „icter caroten ic". În cazul scăderii transformării carotenilor în vitamină A, coexistă starea de hipercarotinemie cu hipovitaminoza A.

Vitaminemia A se situează între 100—300 U.I, respectiv 20—50 μg/100 ml, din care 10—17% sub formă de esteri. Se consideră că transportul către ficat se face sub formă de esteri ai retinolului legaţi de lipoproteidele cu densitate mică Sf 10—100 (în proporţie de aproximativ 80%) şi mai puţin cu Sf 3—9 (8,6%) şi chilomicroni (7,5%); transportul de la ficat spre diferite ţesuturi s-ar face sub formă de retinol, vehiculat de lipoproteidele cu densitate mare Sf: 3—9 (20%), dar mai ales de alte proteine (70%). Transportorul specific al retinolului la om este un complex „prealbumine-proteine specifice de legare a retinolului" denumit „RBP" („retinol binding protein") *(P. A. Peterson, 1971)*.

La persoanele cu malnutriţie gravă, cu scăderea proteinelor totale serice, apare şi o scădere a nivelului vitaminemiei A, din cauza deficitului proteinei

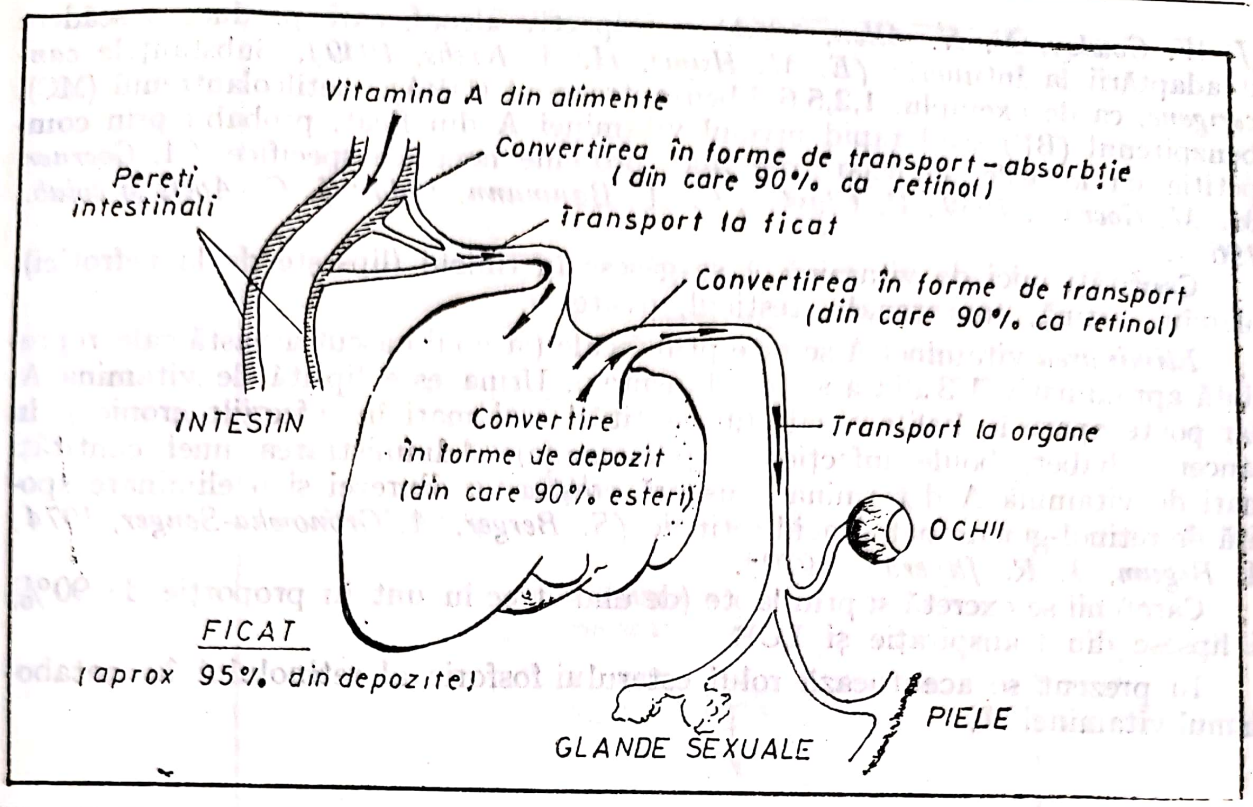


Fig. 2.7. Transportul, depozitarea și transformarea vitaminei A (Schemă simplificată, după H. A. Ketz, 1976).

transportoare („RBP"). În asemenea cazuri, simpla administrare a vitaminei A este ineficientă, în timp ce combaterea malnutriției, cu normalizarea nivelului proteinelor plasmatice, prin suplimentare cu aminoacizi (lizina manifestă efectul optim în corectarea nivelului hepatic și seric al vitaminei A), aduce cu sine și creșterea nivelului vitaminemiei A, ceea ce sugerează posibilitatea unor carențe în vitamină A, independente de aportul acesteia *(V. R. Lala, V. Reddy, 1970; M. K. Horwitt, C. C. Harvey, M. T. Searcev, 1971)*.

Depozitarea se face în *ficat*, care conține aproximativ 95% din totalul vitaminei A (220—500 U.I. respectiv 60—120 μg/g ficat proaspăt) și care poate asigura necesitățile umane timp de cîteva luni. Foarte bogat în vitamină A este ficatul unor pești oceanici (60.000 μg/100 g) și al ursului polar (20.000—50.000 U.I. vit. A/kg).

Depozitarea se face în special sub formă de *esteri ai retinolului* cu implicarea enzimei „vitamin-A-esterază"; deoarece activitatea acestei enzime este inhibată de NaF, compuși cu arsen: arsenit de Na, dietilaminoacetarsol; diizopropilfluorfosfat, p-nitrofenilfosfat, p-Cl—Hg-benzoat, $CaCl_2$, Tween 20, taurocolat de Na etc., asemenea inhibitori pot afecta depozitarea hepatică și absorbția intestinală, care, de asemenea, necesită esterificări ale retinolului *(P. Sashadr-Satsr, J. Ganguly, 1961)*.

Rezervele hepatice scad în cazul blocării sistemului reticulohistiocitar, în nefrite, bronșite cronice, sifilis, peritonite, ulcere gastrice, hipertensiune arterială și cresc în ciroze, uremie, tirotoxicoză. O eliberare din ficat, cu creșterea vitaminemiei A, se constată după injectarea cortizonei *(J. Clark, R. W. Coburn, 1955)*; vitamină D, care inițial determină o creștere și apoi o scădere a vitaminei A *(V. L. Solynikova, 1938)*; consumul de vin *(S. Idkin, 1941;*

J. W. Cowley, N. N. Allen, 1953) şi respectiv alcool, care produce o scădere a adaptării la întuneric *(E. M. Hume, H. A. Krebs, 1949)*. Substanţele *cancerigene*, ca de exemplu, 1,2,5,6-dibenzantracenul (DBA), metilcolantrenul (MC), benzpirenul (BP) scad rapid nivelul vitaminei A din ficat, probabil prin competiţia cu locurile de legare ale unei proteine hepatice specifice *(A. Goerner, M. M. Goerner, 1939; C. Clayton, C. A. Baumann, 1944; J. C. Abels şi colab., 1962)*.

Cantităţi mici de vitamină A se găsesc în rinichi (lipseşte de la nefrotici), plămîni, retină, suprarenale, testicul, ovare.

Eliminarea vitaminei A se face prin fecale (la noul născut această cale reprezintă aproximativ 1/3 din aportul alimentar). Urina este lipsită de vitamina A, dar poate apare în bolile renale (în cantităţi mai mari în infecţiile cronice), în cancere, diabet, bolile infecţioase (pneumonie). Administrarea unei cantităţi mari de vitamină A determină o uşoară creştere a diurezei şi o eliminare sporită de retinol-glucuronat şi acid retinoic *(S. Berger, A. Gronowka-Senger, 1974; A. Begum, I. R. Jttyerah, 1970)*.

Carotenii se excretă şi prin lapte (de unde trec în unt în proporţie de 90%) şi lipsesc din transpiraţie şi LCR.

In prezent se acentuează rolul esterului fosforic al retinolului în metabolismul vitaminei A.

2.1.2.2.2. ROLUL METABOLIC ŞI INTERACŢIUNILE VITAMINEI A

Vitamina A este un *factor de protecţie* pentru întreaga ectodermă; structurile normale ale ţesuturilor epiteliale: piele, cornee, mucoasele implicate în digestie-absorbţie şi cele ale aparatului respirator şi urogenital sînt vitamin A-dependente; *factor de creştere* şi de reglare a osteoblastelor şi osteoclastelor şi este implicată în *procese moleculare (figura 2.8)* şi în mod special în mecanismul *vederii* (vezi 2.1.2.2.5) precum şi într-o serie de metabolisme intermediare şi in interacţiunile cu alte vitamine, hormoni etc.

În metabolismul *lipidic:* în carenţa vitaminei A (la şobolan) şi în mixedemul uman (metabolism bazal scăzut) apare hiperlipemie şi hipercolesterolemie; în pneumonie (consum exagerat de vit. A) lipemia este scăzută şi revine la normal după administrarea vitaminei A. Ca mecanisme biochimice se menţionează rolul vit. A în oxidarea acizilor graşi, în biosinteza gliceridelor, fosfolipidelor şi a colesterolului şi respectiv a hormonilor steroizi.

Corelaţia cu *glucidele:* prezenţa în alimentaţie a unor cantităţi mari de glucoză, rafinoză, celuloză sau lignină scade conţinutul hepatic al vit. A, dar nu afectează concentraţiile serice *(K. Kibek, I. Tasahi, 1964; S. Berger, A. Gronowska—Senger, 1974)*.

În legătură cu metabolismul *proteic*, vitamina A favorizează asimilarea purinelor şi formarea acizilor nucleici, participînd astfel la regenerarea nucleilor şi biosinteza proteinelor, de interes în creştere şi cicatrizare. În acţiunea asupra epiteliilor se consideră că un metabolit al vitaminei A ar reduce sinteza keratinei prin inhibarea formării legăturilor —S—S— care conferă rezistenţa specifică a scleroproteidelor; în carenţa vitaminei A (lipsa metabolitului menţionat) această inhibiţie (normală) nu mai este operantă şi apare o keratinizare exagerată. Este posibilă însă şi o acţiune directă asupra mucopolizaharidelor (MPZ), deoa-

Scanned with OKEN Scanner

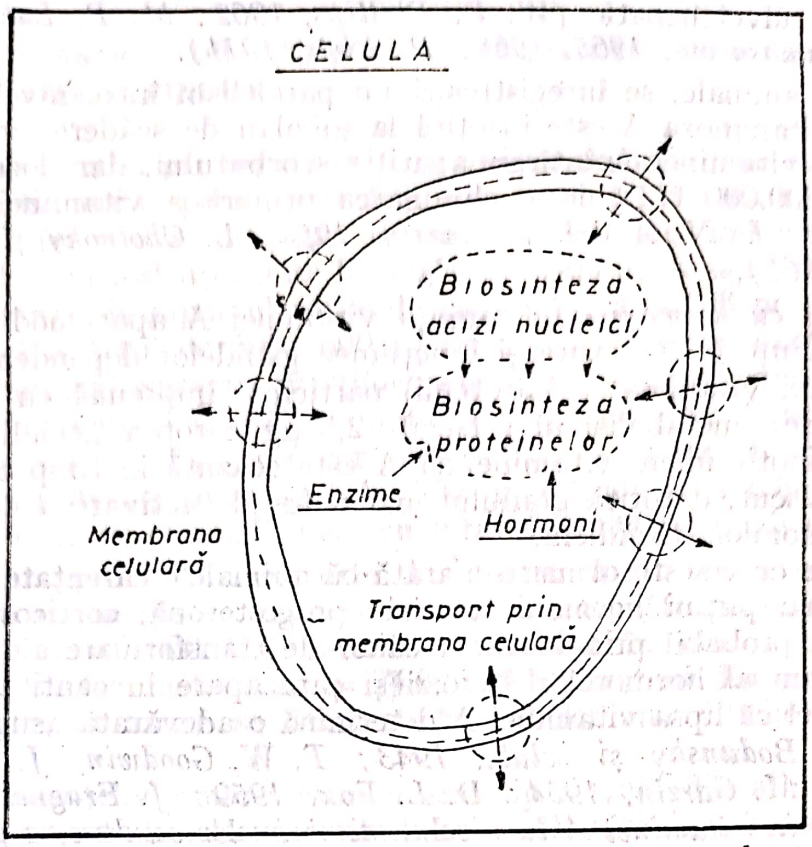


Fig. 2.8. Diagramă schematică a domeniilor de acțiune ale vitaminei A (după H. A. Ketz, 1976).

rece încorporarea ^{35}S în MPZ colonului eviscerat provenit de la animalele carențate, este redusă la jumătate față de a animalelor normale.

Interrelații cu vitaminele. Între *vitamina E* și vitamina A apare un sinergism de acțiune. Vitamina E, administrată *per os*, crește resorbția intestinală a vitaminei A, prin protejarea față de procesele oxidative. În perioada de creștere, necesarul de vit. A este mai mic în excesul alimentar de vitamină E; în carența de vitamină A, administrarea simultană de vit. A, caroteni și vit. E are efecte superioare vitaminei A singure; excesul de vit. A scade necesitățile de vit. E, totuși ele nu se pot înlocui reciproc *(W. J. Pudelkiewicz și colab., 1963; J. Green și colab., 1967; A. Berger, 1970; Agronowska—Senger și colab., 1972, 1973)*.

În ateromatoza experimentală, administrarea simultană a vitaminelor A și E manifestă efecte antiaterosclerotice, cu diminuarea lipidelor totale, ale colesterolului și a dimensiunilor ateromului aortic *(G. Wietiel, U. Schaum, P. Gey, E. Buddecke, 1956)*.

Urmărirea dinamicii instalării carenței în vitamina A relevă o scădere treptată a vitaminei A din ficat și sînge însoțită de o creștere progresivă a vitaminei E din sînge și a *ubichinonei* din testicul și ficat (în fracțiunea microzomală și supernatant), probabil printr-un efect de limitare a catabolismului ubichinonei; în intestin și rinichi nu apar modificări ale ubichinonei. La acestea se poate adăuga și observația că ficatul animalelor carențate în vitamină A reține coenzima Q și ubicromenolul în cantități mai mari și pe durată mai lungă, față de normal și că vitamina A manifestă o acțiune hipoprotrombemică, probabil prin afectarea sintezei *vitaminei K* de către flora intestinală sau prin

interacţiuni la nivel hepatic *(W. E. Phillips, 1962; M. R. Lakshaman, V. C. Jaschi, T. Ramasarma, 1965, 1968; P. Rietz, 1971).*

La om şi animale, se înregistrează un paralelism între nivelul vitaminelor *C* şi A; hipovitaminoza A este însoţită la şobolan de scăderea vitaminemiei C. Administrarea vitaminei A întîrzie apariţia scorbutului, dar dozele excesive de vitamină A (200.000 U.I.) cresc eliminarea urinară a vitaminei C *(T. Sutton şi colab., 1942; L. N. André M. Garzin, 1954; L. Cholnoky şi colab., 1956; T. Terroin, 1966).*

Interrelaţii cu hormonii. În carenţa vitaminei A apar modificări ale *hipofizei,* cu consecinţe în structura şi funcţiunea glandelor dependente. În concentraţii fiziologice, vitamina A (carotenii) participă, împreună cu hormonii tiroidieni în reglarea metabolismului bazal: 2,5 μg caroten „echilibrează" 50 μg tiroxină; la hipotiroidieni vitaminemia A este scăzută în timp ce nivelul carotenilor este crescut, datorită gradului mai redus de activare a carotenazei prin deficitul hormonilor tiroidieni.

Cercetările cu colesterol marcat arată că animalele carenţate în vitamină A sintetizează mai puţini hormoni steroizi: progesteronă, corticosteronă, dezoxicorticosteronă, probabil prin blocarea căilor de transformare ale pregnenolonei, precursor comun al hormonilor steroizi şi care apare în cantităţi crescute; se consideră, astfel că lipsa vitaminei A determină o adevărată „suprarenalectomie chimică" *(O. Bodansky şi colab., 1943; T. W. Goodwin, J. Micorn, 1952; L. N. André, M. Garzin, 1954; D. L. Fox, 1959; J. Fragner, 1964).*

Interacţiunile vitaminei A la nivelul membranelor celulare, a particulelor subcelulare şi enzimatic. Vitamina A, în concentraţii optime, favorizează formarea şi menţinerea legăturilor dintre proteine şi lipide şi exercită astfel un rol major în asigurarea integrităţii structurale şi a permeabilităţii membranelor celulare şi ale particulelor subcelulare şi afectarea acestora în carenţa sau excesul de vitamină A (*J. A. Lucy,* 1963).

Excesul de vitamină exercită asupra fibroblastelor *in vitro* un efect de dilatare şi dezorganizare a membranei celulare şi nucleare. La fel, produce o „umflare" („swelling") *in vitro* a mitocondriilor din ficat şi mai puţin a celor din muşchi (1/4 din efectul asupra mitocondriilor hepatice), splină şi creier; retinalul şi acidul retinoic au efecte mult mai slabe.

Concentraţiile ridicate de vitamină A au un efect de labilizare, cu creşterea permeabilităţii membranelor lizozomiale din ficat, precum şi a condrocitelor şi a fagocitelor peritoneale, cu eliberarea hidrolazelor acide: ribonucleaze, G-6-P-aza, arilsulfatazele A şi B, fosfataze acide etc.; de aceea, de exemplu, fosfataza acidă extrasă din fagocitele peritoneale este mult scăzută în excesul de vitamină A. Efecte similare se constată şi asupra membranei eritrocitare, cu eliberarea hemoglobinei, proces contracarat de vitamina E. Culturile de ţesuturi a cartilajelor embrionului de pui în mediu cu exces de vitamină A arată o scădere de 80% a ADN şi 40% a ARN şi a ratei de absorbţie a O_2, cu creşterea concentraţiei acidului lactic şi a activităţii enzimelor proteolitice (dublarea N acidosolubil din mediul de cultură) ceea ce sugerează ca mecanism de acţiune biochimică eliberarea enzimelor proteolitice din lizozomii condrocitelor *(J. T. Dingle, J. A. Lucy, H. B. Fell, 1961—1963; J. Mc. Howell şi colab., 1967).*

În carenţa vitaminei A se constată un deficit al proceselor de sulfoconjugare al fenolilor; după inj. i.p. a $Na_2{}^{35}SO_4$ se observă eliminarea urinară crescută a sulfaţilor anorganici şi scăzută a sulfoesterilor.

2.1.2.2.3. NECESARUL DE VITAMINĂ A. CAUZELE HIPOVITAMINOZEI A. ANTIVITAMINELE A

Organismul uman primeşte carotenii din legumele şi fructele colorate (morcovi, roşii, caise etc.), porumb şi frunzele verzi şi vitamina A din produsele animale: ficat (în special de peşti oceanici), ouă, lapte, unt etc.

Necesităţile au fost apreciate la 60 U.I. vitamină A sau 200 U.I. β-caroten /kg. greut. corp/zi, în raportul optim de 1/3 vitamină şi 2/3 provitamine. Datele recente fixează aportul de 500—600 μg retinol şi respectiv cantitatea dublă de caroteni ca minimul necesar adulţilor pentru menţinerea concentraţiei vitaminemiei A şi prevenirea apariţiei simptomelor de carenţă. Cantităţile recomandabile sînt de 5.000 U.I./zi, din care 2.500 U.I. ca retinol şi 2500 U.I. ca provitamine, cantităţi ce corespund la 750 μg retinol şi 250 μg echivalenţi de retinoli sub formă de caroteni, deci un total de 1.000 μg echivalenţi retinol.

În eficienţa provitaminelor este de interes cantitatea şi calitatea lor, dar şi forma sub care se găsesc, ceea ce rezultă din următoarea echivalenţă: 5.000 U.I. vitamină A = 8.000 U.I. β-caroten dizolvat în ulei comestibil = 14.000 U.I. caroteni din legumele verzi = 24.000 U.I. caroteni din morcovi; eficienţa scăzută a ultimelor forme se datoreşte absorbţiei mai dificile şi incomplete a vegetalelor.

Cauzele carenţelor umane *primare* sînt lipsa reală din alimente; reducerea transformării provitaminelor în vitamine; tulburări în absorbţia lipidelor şi respectiv a vitaminei A şi carotenilor, ca de exemplu, în afecţiunile stomacului (ulcer, gastrite, intervenţii chirurgicale pe stomac), ale intestinului (colite, dizenterii grave, boala celiacă, fibroza chistică a pancreasului, sprue); afecţiuni ale depozitării şi mobilizării din ficat (ciroza hepatică) şi respectiv deficienţe biliare (icter obstructiv etc.). Cercetările recente arată necesitatea *zincului* pentru menţinerea vitaminemiei A; utilizînd animale deficiente atît în vit. A cît şi în Zn s-a dovedit că acesta este necesar pentru mobilizarea normală a vitaminei A din ficat; pacienţii cu ciroze hepatice au un nivel scăzut al Zn din plasmă şi manifestă tulburări de adaptare la întuneric (hipovitaminoză A) care nu cedează la administrarea vitaminei A singură, ci numai în asociere cu zincul *(H. A. Harper şi colab., 1979)*.

Carenţele *secundare* (condiţionate) sînt determinate de *necesităţile crescute*, care, dacă nu sînt satisfăcute, duc la hipo- sau avitaminoze. Noul născut şi copilul necesită cantităţi relative (pe kg. greut. corp.) de 3—6 ori mai mari decît adultul (aprox. 1.500 U.I./zi) şi în consecinţă hipovitaminozele sînt mai frecvente la aceştia. Bărbaţii necesită cantităţi mai mari decît femeile. Excepţie fac gravidele care cedează fetusului aproximativ 45.000 U.I. vitamină A şi femeile care alăptează, deoarece laptele conţine aproximativ 1.700 U.I. vitamină/litru; în asemenea cazuri, necesităţile se cifrează la 5.000—6.000 U.I. la gravide şi 6.000—8.000 U.I. vit. A în alăptare.

Necesităţi crescute apar şi la muncitorii care lucrează la temperaturi extreme (în special la frig mare) şi în diferite stări patologice: diabet, afecţiuni gastrointestinale şi hepatice, boli febrile, asociate cu infecţii, hipertiroidism şi, probabil, în expunerea la substanţe toxice şi/sau agenţi poluanţi.

Antivitaminele A. Un analog dihidroxilat al retinolului respectiv al retinalului *(P. Meunier)* şi citralul *(E. N. Leach, J.P.F. Lloyd, 1956) (Fig. 2.9)*

Scanned with OKEN Scanner

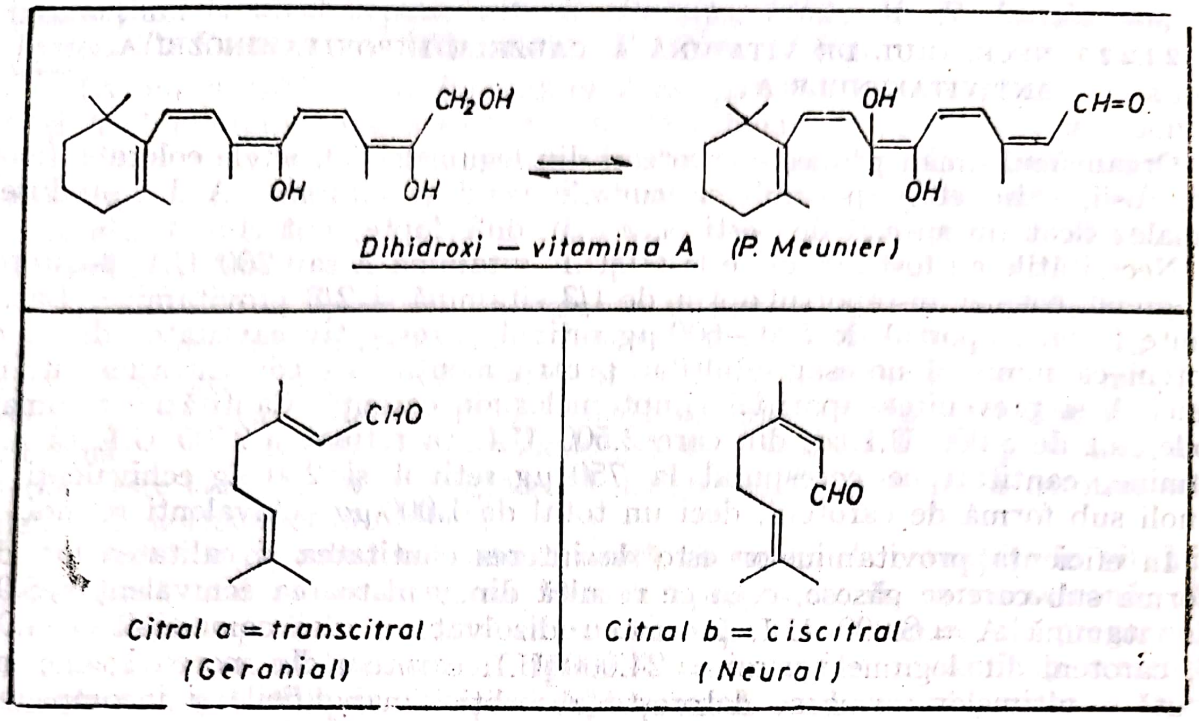


Fig. 2.9. Antivitamine A.

manifestă acţiuni de antivitamină A şi provoacă la animale simptomele avitaminozei A ce pot fi înlăturate prin administrarea unor cantităţi mari de vitamină A.

2.1.2.2.4. ACŢIUNILE VITAMINEI *A*. MANIFESTĂRILE HIPO- ŞI AVITAMINOZELOR *A*

Observaţiile clinice şi experimentale semnalează ca manifestări ale carenţei vitaminei A: încetarea creşterii, pierderea în greutate, scăderea rezistenţei la infecţii şi toxice, tulburări la nivelul ochiului, pielii, aparatului urogenital, digestiv şi respirator şi respectiv ale glandelor exocrine şi endocrine etc., care relevă acţiunile multiple ale vitaminei A.

Vitamina A ca factor de creştere. Vitamina A este necesară creşterii statuare şi ponderale. La copii şi animalele tinere se înregistrează leziuni precoce şi specifice; iniţial este afectat scheletul şi apoi ţesuturile moi. Se înregistrează o încetare a diviziunii celulare şi atrofia celulelor deja formate din ţesutul conjunctiv, respectiv cartilaje; mucopolizaharidele (MPZ), care formează substanţa de bază şi sînt componente importante ale acestor ţesuturi, sînt scăzute în carenţă si cresc prin administrarea vitaminei A.

Alterarea amplasării şi activităţii osteoblastelor şi osteoclastelor, dependentă de specie şi vîrstă, se manifestă prin stagnarea creşterii oaselor, în contrast cu a ţesutului nervos, care se dezvoltă normal şi conduce la leziuni mecanice, cu comprimarea creierului şi măduvei osoase (care nu se pot dezvolta normal în spaţiul restrîns oferit de craniul şi coloana vertebrală, prematur osificate) şi degenerarea nervilor cranieni (mai ales optic, olfactiv, acustic) şi a rădăcinii nervilor periferici şi rachidieni, conducînd astfel la leziuni neurologice secundare.

Scanned with OKEN Scanner

Dinţii prezintă erupţii întîrziate, rădăcini rău implantate şi modificări de formă şi culoare, pe fondul alterării smalţului (email dentar).

Acţiunea epitelotropă. În carenţa vitaminei A sînt afectate toate epiteliile, indiferent de originea lor (ecto-, endo- sau mezodermică). Celulele se atrofiază şi se produce o proliferare „reparatoare", dar celulele noi (din carenţă) sînt diferite de cele normale şi apar sub forma unor epitelii de „keratinizare" şi în consecinţă se instalează deteriorarea glandelor exocrine: lacrimale, din piele, din tractul digestiv (salivare, gastrice, intestinale), respirator şi urogenital. Acumularea celulelor keratinizate în canalele glandulare pot cauza accidente mari: chisturi, ocluzii, abcese, însoţite de infecţii microbiene. La nivelul pielii apare hiperkeratoza, cu obstruarea canalelor glandelor şi reducerea excreţiei sudoripare şi sebacee, cu piele uscată, atrofia bulbului pilos, suprainfecţii şi prurit, constituind „frenodermia" („piele de broască rîioasă"), extinsă pe tot corpul, cu excepţia feţei, pălmilor şi tălpilor.

Acţiunea antiinfecţioasă. Carenţa vitaminei A este însoţită de diferite stări patologice şi infecţii spontane, ca de exemplu: keroftalmie, pielocistite, stări febrile şi alterări ale aparatului respirator (bronchopneumonie), digestiv (scăderea secreţiei gastrice, colite cu diaree mucosanguinolentă), febră puerperală etc., care au condus la aplicarea în scop terapeutic şi la denumirea de vitamină „antiinfecţioasă" (azi părăsită). Totuşi, este de reţinut rolul vitaminei A în creşterea rezistenţei şi apărarea activă faţă de microorganismele patogene, prin mecanisme diferite, între care se relevă: acţiunea favorabilă în asigurarea integrităţii membranelor de barieră a epiteliilor şi a mijloacelor umorale de apărare nespecifică şi respectiv a capacităţii de producere a anticorpilor (anticorpogeneză). Alterarea acestora poate să preceadă semnele caracteristice carenţei.

De la iepurii carenţaţi în vitamină A s-au obţinut culturi pozitive de *Bacillus pyocyaneum* din plămîni (90%) şi inimă (60%), care au lipsit de la animalele normale. La şobolanii carenţaţi în vitamină A (10—25 zile), inocularea unei doze identice de stafilococ piogen sau efectuarea unei incizii sterile, expusă ulterior infecţiei spontane, a provocat flegmoane întinse, necroze şi ulceraţii şi moartea a 82% din animale (în decurs de o lună), în timp ce la animalele normale nu s-au produs decît leziuni circumscrise, care au dispărut (în 10—15 zile) fără nici o pierdere. Mortalitatea şi procentajul culturilor pozitive din ganglionii mezenterici, din ficat sau splină de la şoarecii lipsiţi de vitamină A şi inoculaţi cu aceeaşi doză de *S. typhimurium*, au fost semnificativ mai mari decît la loturile normale.

În privinţa mijloacelor de apărare umorale, la puii de şobolan carenţaţi în vitamină A (4 săptămîni) s-a constatat o scădere a nivelului *properdinei* cu 50—68% faţă de martori; doza de 1,4 U.I. retinol a asigurat creşterea în greutate, dar nu a corectat nivelul properdinei. La iepurii carenţaţi în vitamină A, concentraţia anticorpilor (hemolizine) în a 8-a zi după imunizarea contra hematiilor de ovine sau bovine, era de 10—300 de ori mai scăzută decît la animalele de control. Titrul de anticorpi, determinat la o săptămînă după ultima inoculare i.p. cu *Salmonella pullorum* la purceii carenţaţi în vitamină A a fost de 24,7 ± 5,98, faţă de 308,6 ± 59,69 unităţi la martori, cu o corelaţie semnificativă între aceştia şi vitaminemia A. *(I. Gonţea, 1971).*

În ansamblu, se poate considera că vitamina A creşte rezistenţa organismului şi scade incidenţa şi gravitatea unor boli cauzate de alterarea barierelor de rezistenţă a celulelor epiteliale şi respectiv a mucoaselor şi printr-o apărare umorală activă ca în producerea septicemiilor (salmoneloze, colibacciloze, pasteureloze), coriză, parazitoze (capillaria, monilla) etc.

Rolul vitaminei A în funcţiile aparatului genital şi în reproducere. În carenţa vitaminei A, apare keratinizarea celulelor vaginale (urmărite în testul „kolpokeratozei"), tulburări ale ciclului, iar la mascul scăderea greutăţii testiculelor (de exemplu, la şobolan de la 1,15 g la 0,54 g) şi atrofia tubilor seminiferi cu

Scanned with OKEN Scanner

scăderea spermatogenezei (oligospermie) ce pot duce, la ambele sexe, pînă la sterilitate ; la femelele uşor carenţate capacitatea de reproducere scade cu 15—20% de asemenea şi producţia de ouă la păsări, constituind astfel probleme de interes economic.

Vitamina A participă şi în biosinteza hormonilor sexuali manifestînd efecte sinergice, de exemplu, progesterona atenuează, la şobolanca impuberă, semnele carenţei vitaminei A.

Importanţa nivelului optim al vitaminei A asupra *embriogenezei* rezultă din observaţia că în carenţă creşte numărul puilor născuţi morţi şi cu malformaţii ; femeile cu carenţe în vitamină A pot naşte copii cu malformaţii : anoftalmie, microftalmie, microcefalie.

Excesul de vitamină A prezintă efecte toxice-teratogene similare ; la şobolani şi şoareci, 500—3.000 U.I retinol/zi determină 30—50% malformaţii : cheiloschizis, palatoschizis, spina bifida. Un model adecvat pentru urmărirea acţiunilor teratogene este cel al purceilor la care apar defecte oculare şi leziuni retiniene (49% a malformaţiilor), anomalii ale aparatului excretor : rinichi cu forme alterate sau deplasaţi (31—37%) ; defecte ale curburii aortei şi ale inimii (13%), urechi accesorii, palatin despicat şi respectiv gură (buze) de iepure, hidrocefalie etc. *(L. S. Friedericia, E. Holm, 1925 ; Miller şi colab., 1953—1954 ; J. N. Thompson, J. M. C. Howell, G. Pitt, 1961 ; I. Gonţea, 1971, H. Tuchmann—Duplessis, 1974).*

Acţiunea asupra ochiului. Cele mai importante semne ale carenţei vitaminei A se manifestă la nivelul ochilor, cu apariţia gradată şi progresivă a unor tulburări funcţionale şi morfologice.

În cadrul tulburărilor *funcţionale* se înregistrează *nictalopia* (alterare a bastonaşelor), cu reducerea adaptării de la lumină la întuneric, şi *hemeralopia*, scăderea capacităţii vizuale şi îngustarea spectrului vizibil : extremele spectrului (roşu şi violet) nu mai sînt percepute şi duc astfel la reducerea vederii în întuneric („scotoptică") şi seara (cînd predomină culoarea roşie şi violetă), cu imposibilitatea de orientare, de a distinge contururile obiectelor şi oboseala, de exemplu, la citit, stare cunoscută în popor sub denumirea de *„orbul găinii"*. Aceste tulburări apar primele şi sînt reversibile, cedînd la cîteva ore după administrarea vitaminei A.

În continuare, se instalează alterările anatomo-morfologice, din ce în ce mai grave. *Xeroza corneei*, cu uscarea ochiului şi keratinizare ; metaplazia canalelor şi atrofia glandelor lacrimale, cu scăderea lacrimilor şi, în consecinţă, umectarea insuficientă şi lipsa *lizozimului*, factor de protecţie antimicrobiană. Se manifestă astfel *xeroftalmia*, caracterizată prin leziuni trofice ale epiteliilor conjunctivale, cu vascularizarea, keratinizarea şi opacefierea corneei. Pe acest fond se trece la stadiul de *keratomalacie*, cu suprainfecţii, de exemplu cu *Bac. xerosus* (faţă de care ochiul nu mai este protejat din cauza lipsei lizozimului din lacrimi), cu puroi, ulceraţii, necroza corneei şi perforarea ochiului, procese ireversibile, care compromit vederea (majoritatea copiilor nevăzători din Extremul Orient, în special din oraşele cu dezvoltare rapidă : Hong-Kong, Djakarta, Saigon etc.).

În cazul unei subcarenţe prelungite apare, ca un semn distinctiv, *„pata Bitôt" (1863)*, o îngrămădire de puncte albe strălucitoare, sidefii, cu dimensiuni de 8/5 mm, localizate pe conjunctiva bulbotemporală, lîngă corneea transparentă, fără ulceraţii.

2.1.2.2.5. PARTICIPAREA VITAMINEI A ÎN PROCESUL VEDERII. ACȚIUNEA RETINOTROPĂ. MECANISMELE BIOCHIMICE (MOLECULARE) ALE EXCITAȚIEI VIZUALE

Ochii care „rezolvă" imaginile se întîlnesc numai la 3 linii filogenetice („phyla"): moluște, artropode, vertebrate. Ochii acestora diferă anatomic (sugerînd că au evoluat independent), dar folosesc un cromofor comun, identic, *11-cis-retinalul*, în molecula lor fotoreceptoare din retină, reprezentînd astfel un exemplu ilustrativ de evoluție „convergentă".

RETINA este o membrană fină; jumătatea sa posterioară reprezintă *retina vizuală*, fotosensibilă, care conține două tipuri de celule fotoreceptoare, activate de către lumină:

— *conurile*, în număr de aproximativ 3 milioane, de dimensiuni mai mici, situate în partea mai centrală a retinei vizuale, adaptate pentru lumina puternică și responsabile de vederea deplină, colorată și

— *bastonașele*, din partea periferică a retinei vizuale, în număr de aproximativ 1 bilion. Ele nu percep culorile și sînt adaptate pentru vederea slabă, crepusculară și nocturnă, numită „scotoptică" (vederea în întuneric).

Procesul fotosensibilității este inițiat la nivelul bastonașelor sau conurilor din retină, prin absorbția luminii de către pigmenții vizuali, care constituie *„instrumentele moleculare ale vederii"* și anume: rodopsina (purpura vizuală) din bastonașe și pigmenți cu proteine diferite în conuri (de exemplu, iodopsina, cianopsina). Celulele fotoreceptoare convertesc lumina în mișcare atomică și aceasta în impuls nervos. Bastonașele și conurile stabilesc sinapse (legături) cu celulele bipolare, care, la rîndul lor, interacționează în retină cu alte celule nervoase. Semnalele electrice generate de fotoreceptori parcurg o arie intricată în zona celulelor nervoase din retină și sînt transmise prin fibrele nervilor optici în creier. Retina are deci o funcție dublă: de transformare a luminii în impulsuri nervoase și de „integrare" a informației vizuale.

Bastonașele, mai intens studiate din punct de vedere biochimic, sînt structuri subțiri, alungite, zvelte, tipice cu lungimea de 40 μm și diametrul de 1 μm *(Fig. 2.10)*.

Funcțiile biochimico-fiziologice ale retinei sînt distinct compartimentate, într-un mod special, în cadrul segmentului „extern" și „intern"; întregul ansamblu este delimitat de o membrană plasmatică.

Segmentul *extern* constituie formațiunea specializată pentru fotorecepție (cu un turn-over de

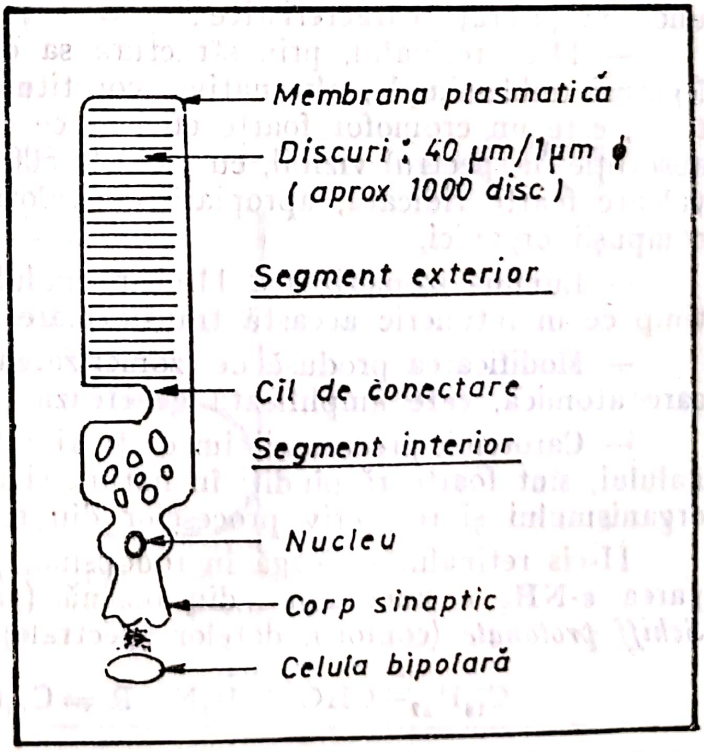


Fig. 2.10. Diagrama schematică a celulelor în bastonaș din retină (după L. Stryer, 1975).

refacere de aproximativ zece zile). El conţine un pachet de aproximativ 1.000 discuri suprapuse, aşezate pe axul lung al bastonaşelor.

Segmentul *intern* are caracteristicile celulelor obişnuite, generatoare de energie. El este bogat în ribozomi, implicaţi în biosinteza proteinelor, respectiv enzimelor şi în mitocondrii, care generează cu mare viteză şi intensitate ATP. Segmentul intern atinge nucleul, care este învecinat cu corpul sinaptic şi respectiv cu veziculele sinaptice, care stabilesc legături (sinapse) cu celula bipolară, implicată în transmiterea „semnalelor" declanşate de excitaţia vizuală.

Mecanismele biochimice (moleculare) ale excitaţiei vizuale. Observaţia că celulele în bastonaş din retina umană pot fi excitate de *un singur foton (Seling Hecht, 1938)* a condus la cercetări aprofundate asupra mecanismelor biochimice implicate în receptarea luminii, amplificarea excitaţiei luminoase *(G. Wald)* şi în conversia acesteia în „semnale" proprii celulelor nervoase.

Reacţiile biochimice ale excitaţiei vizuale se declanşează prin acţiunea luminii asupra pigmenţilor vizuali din segmentul extern al bastonaşelor din retină. Cînd o moleculă de rodopsină este excitată de un foton, se eliberează un electron şi energia produsă se îndreaptă spre capătul opus al bastonaşului, asigurînd astfel transmiterea „informaţiei" vizuale.

Bastonaşele sînt alcătuite din lipide (20—40%), proteine (40—50%) între care se situează şi *rodopsina* (4—10%); aspectul general este acela al membranelor biologice, cu structuri plane, ce se succed la aproximativ 120 Å, prezentînd unele asemănări cu cloroplastele.

Rodopsina este o cromoproteidă (Ø de aproximativ 50 Å) cu greut. mol. de 67.000 la broască şi 38.000—40.000 la om şi bovine. Partea sa proteică este o *opsină*, denumită *„scotopsină"* (scotos = intuneric), de care se leagă gruparea cromoforă, *aldehida vitaminei A* sub forma izomerului *11-cis-retinal* (neo-b-retinal), *prezentă şi identică în toţi pigmenţii vizuali*, inclusiv în conuri, datorită unor proprietăţi caracteristice:

— 11-cis-retinalul, prin structura sa de poli-en, în care cele 6 perechi de legături duble-simple, alternative, constituie o reţea lungă nesaturată de electroni, este un cromofor foarte eficient ce conferă rodopsinei o bandă largă de absorbţie în spectrul vizibil, cu picul la 500 nm şi o intensitate de 40.000 cm^{-1}, valoare foarte ridicată, apropiată de valorile maxime care pot fi obţinute cu compuşii organici,

— Lumina izomerizează 11-cis-retinalul la trans cu mare intensitate, în timp ce în întuneric această transformare este neglijabilă,

— Modificarea produsă de izomerizarea *cis* → *trans* este convertită în mişcare atomică, care amplificată generează impulsul nervos,

— Carotenii, precursorii imediaţi ai vitaminei A şi respectiv a 11-cis-retinalului, sînt foarte răspîndiţi în natură şi asigură, normal, cantităţile necesare organismului şi respectiv proceselor din retină.

11-cis retinalul se leagă în rodopsină, prin gruparea sa aldehidică cu gruparea ε-NH_2 a unei lizine din opsină (partea proteică) sub forma unei *baze Schiff protonate* (conform datelor spectrale):

$$C_{19}H_{27}-CHO + H_2N-R \rightleftharpoons C_{19}H_{27}-\underset{H}{C}=\overset{+}{\underset{H}{N}}-R + H_2O$$

11-cis-retinal — *ε-NH₂-Liz* (opsina) — *Baza Schiff (protonată)*

Secvența primilor 8 aminoacizi din opsină (H_2N-R), în partea care leagă cromoforul (11-cis-retinalul) este următoarea:

RETINAL—CH=$\overset{+}{N}$H-ε-Liz-Ile-Pro-Thr-Phe-Ala_3 *(Bowdns, 1967) (Fig. 2.11).*

Evenimentul „primar" al excitației vizuale (G. Wald). Sub acțiunea luminii, 11-cis retinalul „absoarbe" lumina și are loc o izomerizare stereochimică, cu formarea all-trans-retinalului, cu degajare de energie, deoarece acesta este mai sărac în energie și mai stabil. Prin această transformare se înlătură impedimentul steric impus de legătura 11-cis și astfel electronii suplimentari ai dublelor

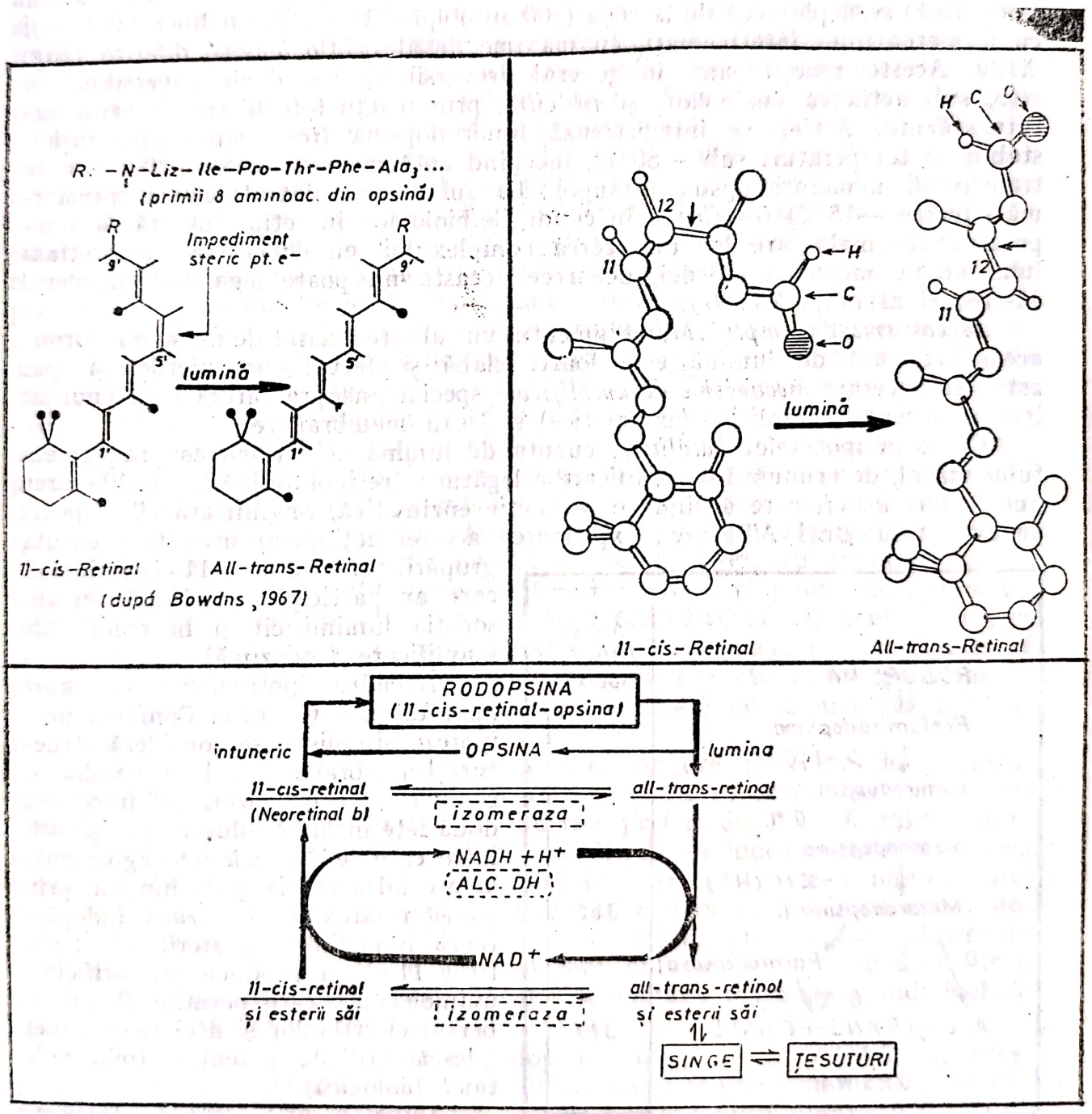


Fig. 2.11. A. Izomerizarea „cis-trans" sub influența luminii (două reprezentări). B. Participarea retinalului în ciclul vederii (Wald).

legături, se pot deplasa în izomerul trans, pe o anumită distanță, toți în același sens, rezultatul fiind ca și cum un singur electron s-ar deplasa „înainte și înapoi" *(Futterman, 1965; B. Sparling, 1969) (Fig. 2.11)*.

Ca urmare a izomerizării *cis* → *trans* au loc modificări importante ale complexului labil „opsină-retinal", cu alterarea marcată a geometriei moleculei rodopsinei: legătura Schiff a retinalului se *„mișcă"* cu aproximativ 7 Å, în raport cu ciclul cromoforului. Rodopsina naturală are aproximativ 60% din structura sa în formă helicală, din care 1/5 se pierde sub influența luminii, cînd are loc „decolorarea" rodopsinei. Maximul de absorbție al complexului (rodopsină) se deplasează de la roșu (500 nm) spre al retinalului liber (380 nm), cu formarea unor intermediari, cu maxime de absorbție (culori) diferite *(Fig. 2.12)*. Aceste reacții sînt în general ireversibile, dar devin reversibile, *in vivo*, sub acțiunea enzimelor, și *in vitro*, prin reacții fotochimice la temperaturi scăzute. Astfel, se înregistrează lumirodopsina (roșie sau orange-roșie), stabilă la temperaturi sub —50 °C; începînd cu temperatura de —20 °C ea se transformă în metarodopsina (orange); La un moment dat al acestor transformări (peste —15 °C) *in vitro* și în condițiile biologice, în retina integră, la temperatura normală, are loc desfacerea complexului, cu eliberarea trans-retinalului de pe molecula opsinei, deoarece aceasta nu poate lega decît izomerul 11-cis-retinal *(Fig. 2.11.B)*.

Mecanisme de amplificare. Pigmentul vizual este excitat de un singur foton; această cuantă de lumină este foarte slabă și efectul s-ar „pierde" și apar astfel ca necesare *mecanisme de amplificare* speciale, asupra cărora s-au enunțat ipoteze diferite: catalitice (enzimatice) și / sau membranare.

Conform ipotezelor *catalitice*, cuanta de lumină ar acționa asupra pigmentului vizual, determinînd o modificare a legăturii „retinol-opsină", cu eliberarea unor *centri activi*, care ar induce o reacție enzimatică, amplificată. Rodopsina ar avea rolul unei ATP-aze; exprimarea acestei acțiuni ar necesita prezența grupării cromofore, 11-cis-retinalul, care ar participa astfel atît în absorbția luminii cît și în reacția de amplificare (coenzimă).

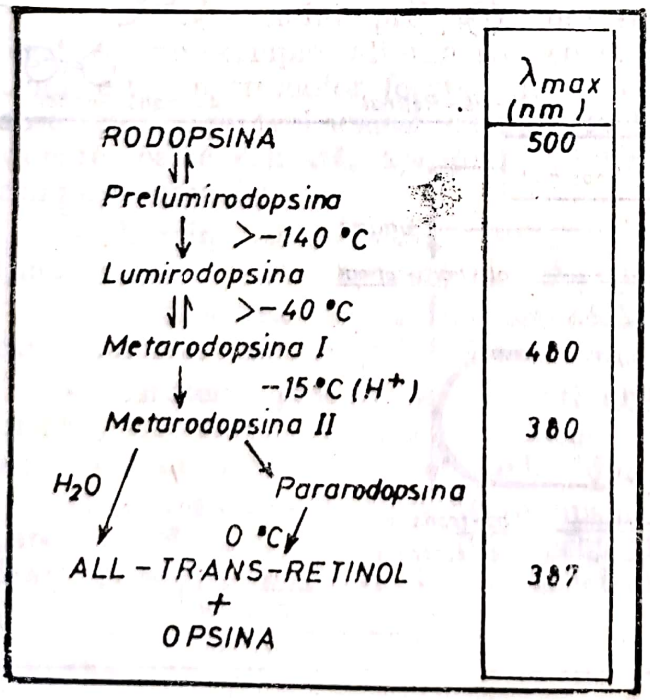


Fig. 2.12. Descompunerea rodopsinei sub influența luminii

În cadrul ipotezelor *membranare* apar diferite variante. Conform unei ipoteze, simpliste, se consideră structura membranară a bastonașelor și conurilor ca un „izolator" între cele două fețe încărcate diferit (+ și —), între care se situează fotopigmentul; la nivelul acestuia, *q* de lumină, prin transformarea *cis* → *trans* îndepărtează impedimentul steric al legăturii 11-cis și produce un „orificiu" unimolecular, care permite fluxul liber al electronilor și declanșarea unei „descărcări" de potențial (pilă voltaică biologică).

După o altă ipoteză *(Daemer, Banting; Poincelet, 1969)*, 11-cis-retinalul din rodopsină ar fi atașat de o

moleculă cu caracter lipidic: fosfatidiletanolamina (PEA); grupul cromofor ar rămîne legat de aceasta pînă la stadiul de metarodopsină I şi în cursul transformării acesteia în metarodopsina II s-ar produce izomerizarea la all-trans-retinal, cu migrarea spre grupa ε-NH_2 a Liz din scotopsină. Transferul fotolitic al cromoforului de la PEA la proteină are loc într-un timp de 100 μsec şi susţine ipoteza depolarizării membranelor celulare (bastonaşe).

Concepţia modernă asupra biochimiei vederii. Evenimentul primar (G. Wald) constă, după cum s-a menţionat anterior, în izomerizarea 11-cis-retinalului la all-trans-retinal, cu modificări conformaţionale ce duc la „decolorarea" rodopsinei şi desfacerea all-transretinalului de opsină; prin aceste procese energia fotonului este convertită în mişcare atomică (în aproximativ o milisecundă).

Următorul pas important este generarea influxului nervos, proces studiat prin metodele electrofiziologice pe retina intactă. Membrana plasmatică a segmentului extern al bastonaşului se hiperpolarizează în aproximativ 10 milisecunde după iluminare şi revine rapid la nivelul iniţial, cînd lumina nu mai acţionează (atunci cînd segmentul respectiv intră în „repaus"); în aceste procese rolul major se atribuie „mişcărilor" ionilor de Na^+. Membrana segmentului extern este neobişnuit de permeabilă pentru Na^+ la *întuneric*, cînd are loc o pătrundere puternică a ionilor de Na^+ din segmentul extern, ce induce un gradient de concentraţie al Na^+ susţinut printr-un sistem transportor activ, *„pompa de Na^+—K^+"*, localizată în interiorul membranei segmentului extern; în continuare, ionii de Na^+ difuzează („curg") în segmentul intern, de unde sînt eliminaţi printr-o „pompă" dependentă de ATP (produs în concentraţii ridicate chiar în acest segment). Efectul *luminii* ar fi „blocarea" canalelor pentru Na^+ din segmentul extern, cu scăderea fluxului de pătrundere al Na^+, prin care interiorul membranei devine mai negativ; această „hiperpolarizare" este transmisă, pasiv, de către membrana plasmatică (care învelește bastonaşul), spre corpul sinaptic. Aceste schimbări ale permeabilităţii şi hiperpolarizarea sînt răspusuri *puternic amplificate*, la nivelul segmentului extern raportul fotocurent/număr de fotoni absorbţi fiind de 10^5—10^6. Acest răspuns este „jumătate maximal" cînd numai 30 fotoni sînt absorbiţi de către un segment extern, ce conţine aproximativ 40 milicane de molecule de rodopsină; de aici rezultă că proprietăţile membranei plasmatice sînt puternic alterate („hiperpolarizare"), cînd o singură moleculă dintr-un milion este excitată de lumină, respectiv de un foton.

Mecanismul prin care izomerizarea unei singure molecule de cromofor, 11-cis-retinal, din membrana unui disc este capabilă să determine modificarea permeabilităţii membranei pentru Na^+ nu este perfect elucidat. Distanţa dintre aceste locuri, care poate fi de cîteva mii de Å, exclude probabilitatea unei cuplări conformaţionale directe şi sugerează că „semnalul" din membrana unui disc excitat este, probabil, comunicat la nivelul membranei plasmatice a bastonaşului printr-un transmiţător difuzibil, de exemplu, ionii de Ca^{2+}. Astfel, în iluminare, pentru fiecare foton absorbit s-ar elibera cîte un ion de Ca^{2+} în mediul dintre discuri şi care ar difuza către membrana plasmatică unde închide „porţile" pentru Na^+ *(Fig. 2.13)*.

Există posibilitatea ca molecula rodopsinei, lungă de cel puţin 75 Å, corespunzător orientată, să traverseze membrana discului şi să funcţioneze ca o „poartă" activată („deschisă") de către lumină; conform unei ipoteze diferite (catalitică), rodopsina ar fi o preenzimă care devine enzimă (activă) prin lumină, amplificînd astfel reacţia.

Scanned with OKEN Scanner

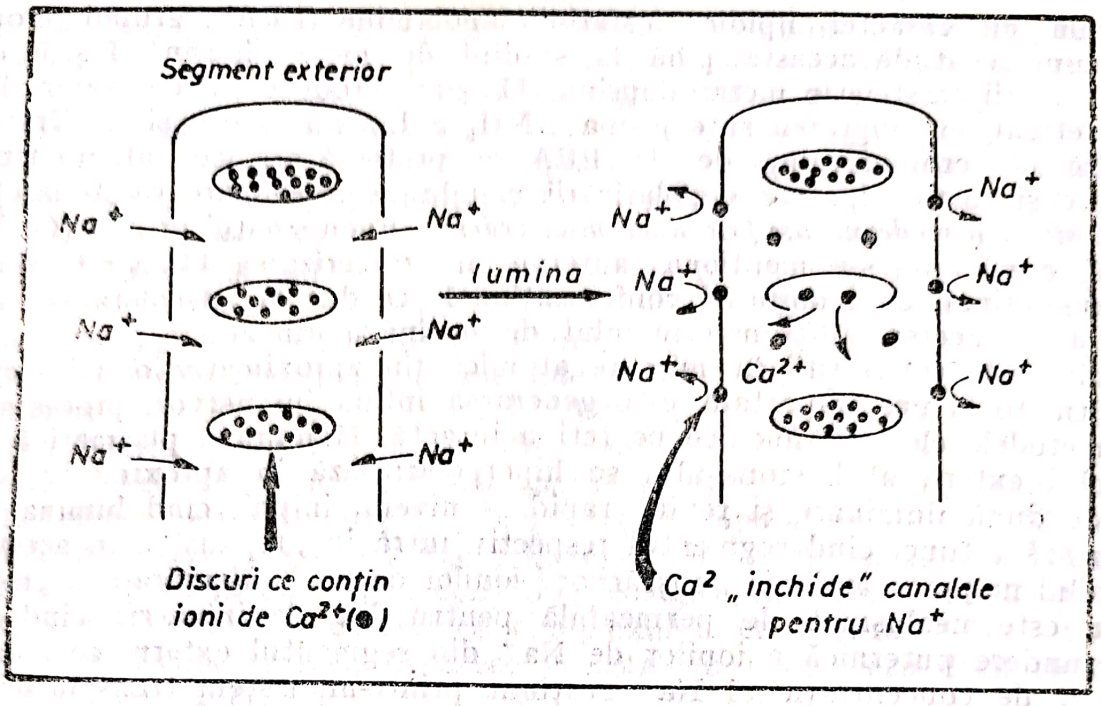


Fig. 2.13. Eliberarea ionilor de Ca^{2+} din discurile segmentului exterior al bastonaşului sub efectul luminii, cu blocarea fluxului ionilor de Na^+ (după L. Stryer, 1975).

Procese enzimatice în „ciclul vederii" Procesul vederii reprezintă o secvenţă de reacţii (evenimente) biochimice care se desfăşoară *ciclic:* în cursul excitaţiei luminoase au loc reacţiile de „decolorare" ale rodopsinei, cu eliberarea opsinei şi all-trans-retinalului. În întuneric (segmente ale bastonaşului „în repaus") se desfăşoară reacţiile de „refacere", respectiv transformarea all-trans-retinalului în 11-cis-retinal, singurul capabil să se lege de opsină pentru a reconstitui rodopsina *(fig. 2.11. B)*. Aceste refaceri implică enzime şi căi diferite.

O mică parte din all-trans-retinal se transformă direct în 11-cis-retinal sub influenţa *transretinalizomerazei;* se consideră că opsina ar funcţiona ca o fotoizomerază, activată de lumină, avînd ca substrat ll-cis-retinalul.

Majoritatea trans-retinalului urmează o cale ocolită: reducerea iniţială la all-trans-retinol (vitamina A), izomerizarea sub această formă la ll-cis-retinol şi oxidarea acestuia la ll-cis-retinal. În acest proces participă, pe lîngă *izomeraza „cis-trans"* şi o *alcool-dehidrogenază*, respectiv *retinol-dehidrogenază*; ele folosesc ca donatori şi acceptori de H sistemul $NAD^+/NADH + H^+$ (coenzimă). Electroforeza pe gel de amidon relevă că retina posedă trei zone pentru aceste activităţi enzimatice: două retinol-DH şi o alcool-DH (ADH), în timp ce ficatul are numai două: o ADH şi o retinol-DH. Zonele celor două ţesuturi nu se suprapun, demonstrînd că enzimele nu sînt identice, ci specializate pentru reacţiile diferite în care participă.

În condiţii normale, în retină se menţine un echilibru între rata desfacerii şi refacerii rodopsinei şi între „retinal ⇌ retinol", care implică relaţii permanente de schimburi cu fondul general de vitamină A al organismului, ilustrate prin relaţia OCHI ⇌ SÎNGE ⇌ ŢESUTURI. Instalarea rapidă a tulburărilor vizuale (hemeralopie) din carenţa vitaminei A se explică astfel prin alterarea vitezei de refacere a rodopsinei din cauza aportului insuficient al precursorilor, ce se traduce printr-un nivel scăzut al rodopsinei din retină *(Fig. 2.11.B)*.

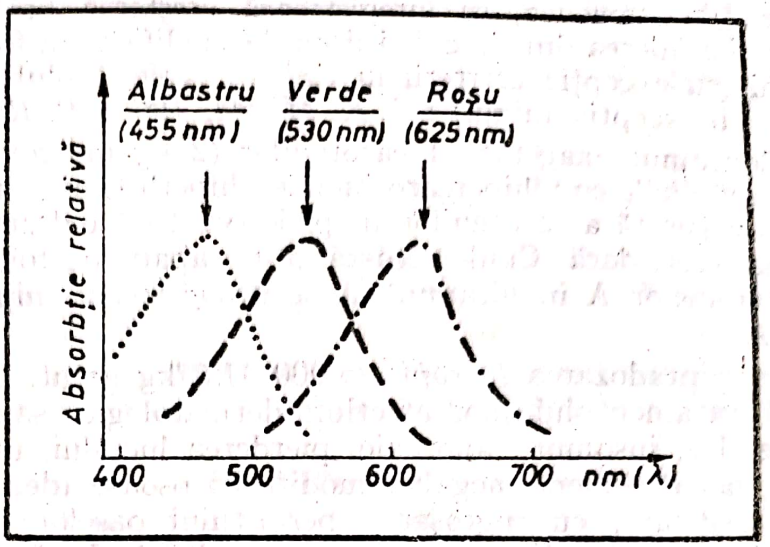


Fig. 2.14. Spectrele de absorbţie a pigmenţilor din cei trei fotoreceptori (L. Stryer, 1975).

Existenţa hemeralopiei independentă de carenţa vitaminei A, de exemplu, în albinism, la bătrîni, în glaucomul cu cataractă, mioză, diabet, în graviditate, în boli hepatice şi respectiv intoxicaţii cu alcool, Pb, As etc. sugerează alterarea echilibrului „retinal ⇌ retinol" şi că în „ciclul biochimic al vederii" (rodopsinei) participă, pe lîngă şi/sau alături de vitamina A, şi enzime care necesită cofactori vitaminici (vit. B_1, B_2), modulatori ai lungimilor de undă (vit. B_2) şi alţi factori hormoni şi/sau de altă natură, mai puţin cunoscuţi.

Vederea colorată. Vederea deplină, colorată, este mediată prin trei receptori fundamentali *(Thomas Jang, 1802)*. Cercetările spectrofotometrice pe retina intactă, realizate cu 150 de ani mai tîrziu, atît prin excitarea cu raze de lumină foarte subţiri (1 μm), cît şi prin implantarea de microelectrode în celulele retinei, confirmă existenţa celor trei feluri de celule conice. Spectrele de acţiune pentru hiperpolarizarea membranei plasmatice determinate pe conurile peştelui auriu au maximul în albastru (455 nm), verde (530 nm) şi roşu (625 nm). Cromoforul pigmenţilor din cele trei tipuri de conuri este tot 11-*cis-retinalul* (universal pentru toţi pigmenţii vizuali). Proprietăţile acestei grupe prostetice sînt modulate prin interacţiunile sale cu partea proteică (opsina) diferită în cei trei pigmenţi şi anume: *cianopsina* (cu maximul de absorbţie în albastru), *iodopsina* (în verde) şi porfiropsina (în roşu) *(fig. 2.14)*.

Majoritatea formelor de orbire (cecitate) la culori sînt cauzate de mutaţii recesive legate de sex (1% din bărbaţi nu percep culoarea roşie şi 2% cea verde); determinările spectrale arată lipsa moleculei fotoreceptorului pentru culoarea respectivă şi sînt deci cauzate de absenţa unui anumit tip de opsină din conuri *[J. Fragner (1964); E. Buddecke (1974); H. A. Ketz (1979); L. Stryer (1975); H. A. Harper. V. W. Rodwell, P. A. Mayes (1979)]*.

2.1.2.2.6. HIPERVITAMINOZA *A*

Cantităţile mari de retinol produc la animale fenomene de intoxicare: pierderea în greutate, decalcefieri osoase masive prin ruperea echilibrului dintre activitatea osteoblastelor şi osteoclastelor, blana îşi pierde luciul şi începe să cadă, apar edeme în jurul botului şi ochilor şi cruste la pleoape; hemoragii intes-

tinale; de asemenea, se înregistrează creşterea lipidelor din ficat, intestin şi creier şi scăderea din rinichi şi lipsa de modificare a fosfolipidelor şi a metaboliţilor săi (cu excepţia creşterii în rinichi); colesterolul este crescut în toate ţesuturile (cu excepţia inimii) *(U. K. Mistra, 1965; P. Rietz, 1917)*.

Consumul exagerat al carotenilor (2 kg morcovi/zi/o lună) produce „icterul carotenic", cu: hipercarotinemie, hiperlipemie, hipercolesterolemie, depozitarea exagerată a carotenilor în piele (xantoză cutanată), hepato-spleno-megalie, anemia secundară. Cînd această stare apare pe fondul scăderii transformării provitaminelor A în vitamină A se înregistrează hipercarotinemie cu avitaminoza A.

În supradozarea *la copii* (5.000 U.I./kg greut. corp./zi/timp de 5 zile), în scopul tratamentului unor afecţiuni dermatologice sau pentru creştere, se observă: cefalee, insomnie, anorexie, pierderea luciului, uscarea şi căderea părului, prurit, hepato-spleno-megalie, modificări osoase (dezvoltarea precoce a punctelor de osificare, cu îngroşarea periostului oaselor extremităţilor şi încetarea creşterii), transpiraţii nocturne, care cedează după sistarea administrării vitaminei A.

Consumul exagerat de untură de peşte (cu 4,5% vitamină A = 3.000.000 µg %), a ficatului unor peşti oceanici (60.000 µg vit. A%) sau de urs polar (20.000—50.000 U.I. vit. A/kg) pot provoca şi la adulţi: depresie, somnolenţă, greaţă şi descuamări ale pielii în jurul gurii. Dozele mari de vitamină A (1.000.000 U.I.) produc adevărate intoxicaţii, manifestate prin oboseală, cefalee, tulburări cutanate (dermatite, descuamări ale pielii), căderea părului.

Hipervitaminoza A (intoxicaţii cronice prin consumul a 40.000—600.000 U.I./zi, pe perioade de cîteva luni pînă la 9 ani) se manifestă prin o stare de slăbire, căderea părului, erupţii cutanate, cefalee, înţepenirea muşchilor, dureri osoase, hepate-spleno-megalie, papiledema *(M. D. Muenter, H. O. Perry, J. Ludwig, 1971)*, iar la un pacient care a consumat 40.000 U.I. vit. A/zi timp de 6—7 ani s-a înregistrat ciroză şi hipertensiune portală, atribuite excesului de vitamină A *(R. R. Babb, J. H. Kierlado, 1978)*.

În general, dozele mari de vitamină A pot genera reacţii adverse: cutanate (xerodermie); la nivelul sistemului nervos central (cefalee, delir); oculare (nevrită optică cu edem papilar).

Se consideră că un surplus de 2.000 echivalenţi retinol (6.700 U.I.) pe zi de vitamina A preformată, reprezintă un risc şi necesită supraveghere medicală; de asemenea, se atrage atenţia asupra evitării excesului de vitamină A la gravide, datorită efectelor sale teratogene *(H. A. Harper şi colab., 1979)* (2.1.2.2.4.).

2.1.2.2.7. INDICAŢII TERAPEUTICE

Preparatele de vitamină A se utilizează profilactic, în creşterea rezistenţei la infecţiile căilor respiratorii, şi terapeutic în convalescenţa infecţiilor respiratori; graviditate; lactaţie, prurit anogenital. În pediatrie, la sugarii alimentaţi artificial şi în convalescenţa după boli infecţioase de durată. În O.R.L., în ozenă, rinita atrofică, rinofaringite uscate; hipoacuzie (afecţiuni ale urechii interne). În oftalmologie: în hemeralopie (nictalopie), fotofobie, xeroftalmie, keratomalacie. În dermatologie, în acneea vulgaris, arsuri şi plăgi cutanate, ulcere ale gambei; fragilitatea părului şi unghiilor. În endocrinologie, în sterilitate (bărbat), hipertiroidisme. În nefrologie, ca profilatic al litiazei renale. În oncologie, în asociere cu doze mari de vitamină C, pentru ameliorarea stării generale.

Scanned with OKEN Scanner

Acidul retinoic are acţiuni topice; în concentraţie de 0,1% în vehicul de alcool etilic şi/sau propilenglicol, în aplicaţii locale, are efecte favorabile în tratarea acneei vulgaris (cu vindecări în proporţie de 75%, în 3—4 luni, faţă de tratamentul cu peroxid de benzoil, cu 30% vindecări, sau cu resorcinol şi sulf, cu 14% vindecări), şi pentru evitarea formării cicatricelor *(A. M. Klinghan, 1971)*.

2.1.3. CALCIFEROLII. PROVITAMINELE ŞI VITAMINELE D. VITAMINA ANTIRAHITICĂ

Rahitismul („boala engleză") a fost descris din secolul al XVII-lea *(Glisson, 1650)* şi a fost atribuit unor cauze alimentare (*Ghenadie*, secolul al XIX-lea), confirmate prin vindecarea cîinilor cu rahitism experimental cu untură de peşte *(Mellanby, 1917)* şi diferenţiată de factorul A *(E. V. McCollum, N. Simmonds şi colab. 1922)*; în acelaşi timp a fost descrisă şi apariţia rahitismului la animalele ţinute la întuneric şi vindecarea lor prin hrănire cu bucăţi de piele provenite de la cîinii expuşi la soare *(K. Huldinsky, 1919)*.

Ipotezele asupra cauzelor rahitismului se îndreaptă astfel în două direcţii opuse: natura alimentară şi lipsa soarelui. Cercetările ulterioare au adus aceste păreri la un punct comun, prin observarea că iradierea conferă unor alimente proprietăţi antirahitice *(H. Steenbock, 1924)*, prin precizarea că factorul antirahitic se găseşte în partea insaponificabilă a lipidelor alimentare *(A. F. Hess, 1924; O. Rosenheim, 1927)* şi, în special, prin descoperirea *provitaminelor*, cu structură de steroli tetraciclici (inactivi), care se transformă, prin acţiunea fotochimică a radiaţiilor U.V., cu ruperea ciclului II (B) în vitaminele D active, *secosteroli*, cu structură de triciclu *(A. Windaus, 1926—1937)*. Recent, s-a dovedit necesitatea activării secundare a vitaminelor D, prin hidroxilări suplimentare *(J. Lund; H. F. De Luca; A. W. Norman; J. W. Blunt; Y. Tanaka; T. Boyle, 1966—1979)*.

2.1.3.1. *PROVITAMINELE D*

Pentru ca un compus să prezinte proprietăţi de provitamină D este necesar să îndeplinească următoarele condiţii: să aibă un schelet de steran, prevăzut cu un —OH în poziţia 3; două duble legături conjugate (5—6 şi 7—8), în ciclul II (B), şi un lanţ lateral de cel puţin 8 atomi de C ataşat în poziţia 17 a ciclului IV(D); acest lanţ diferenţiază provitaminele D între ele şi nu se modifică în timpul activării.

Pentru provitaminele D_2 şi compuşii obţinuţi prin iradiere se utilizează prefixul „ergo-" sau indicele 2; pentru (pro)vitaminele D_3, prefixul „cole-" sau „chole" sau indicele 3; pentru celelalte, indici numerici (4, 5, 6) sau denumiri convenţionale *(Fig. 2.15)*. Vitamina D_1 nu există, această denumire fiind atribuită unui amestec (cristalizat) de provitamine obţinut în cercetările iniţiale *(A. Windaus, Linsert, Luttring, 1931)*.

2.1.3.1.1. TRANSFORMAREA FOTOCHIMICĂ ŞI OBŢINEREA PROVITAMINELOR D

Mecanismul transformării provitaminelor D în vitaminele D sub acţiunea fotochimică a radiaţiilor U.V. a fost studiat iniţial pe ergosterol (provitamina D_2) şi s-a dovedit similar şi pentru 7-dehidrocolesterol (provitamina D_3) şi pentru celelalte provitamine.

Schema „clasică" *(Windaus)* dă următoarea secvenţă de reacţii:

ERGOSTEROL → LUMISTEROL → TACHISTEROL → ERGOCALCIFEROL

şi, în continuare, *suprasterinele I, II* şi *toxisterinele*.

Scanned with OKEN Scanner

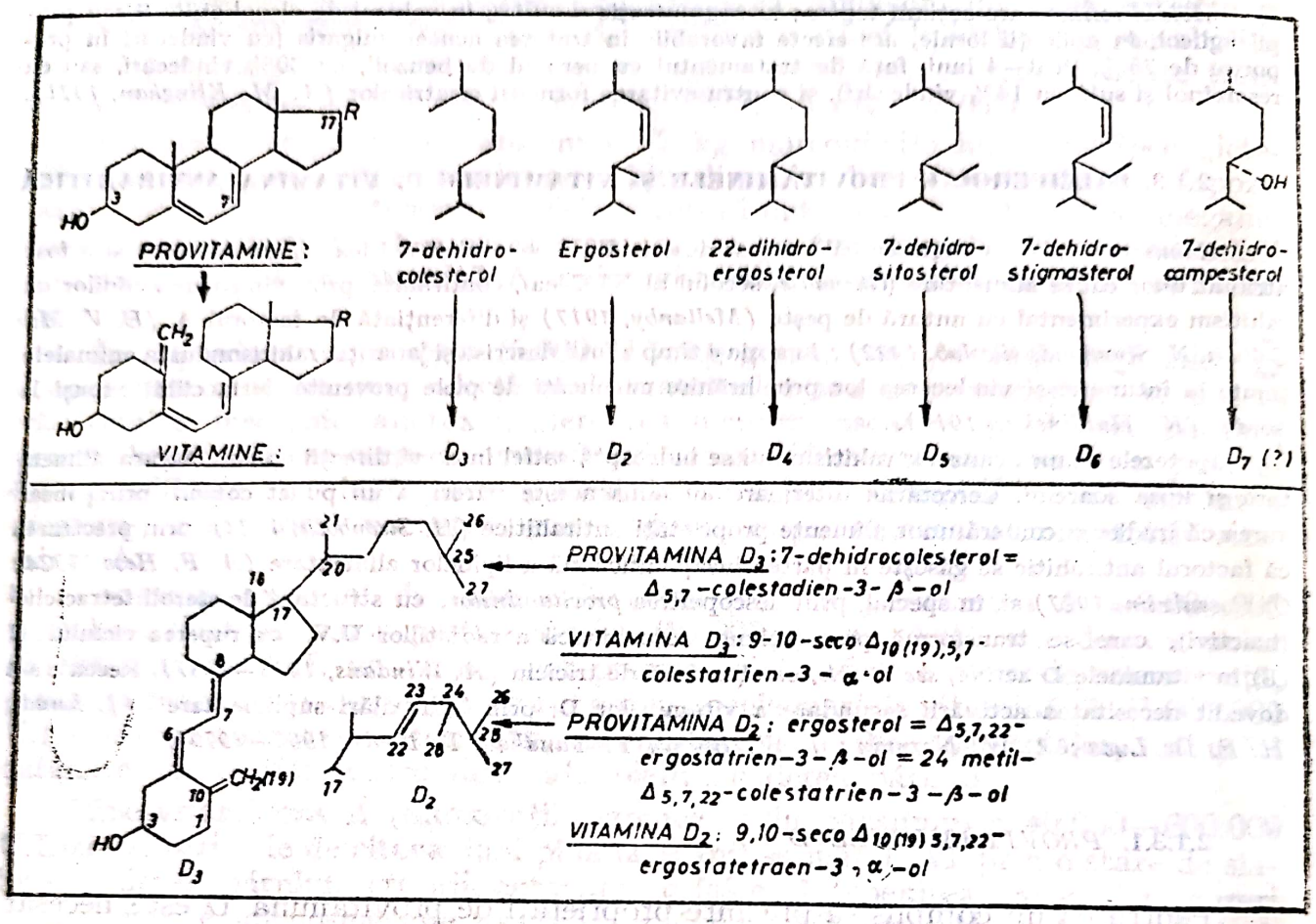


Fig. 2.15. Structura şi denumirea provitaminelor şi vitaminelor D
(In prezent provitaminele se scriu —3—β-ol iar vitaminele —3—α-ol)(vezi fig. 2.16; 2.21).

Pe baza reversibilităţii unor reacţii şi a identificării precalciferolului, se admite următoarea schemă de reacţii *(L. Velluz, 1949; Haringa, 1954)*:

TACHISTEROL
⇅
ERGOSTEROL ⇌ PRECALCIFEROL ⇌ CALCIFEROL
⇅
LUMISTEROL

În continuare, prin suprairadiere se obţin *suprasterine* şi *toxisterine* şi prin încălzire (> 125 °C), *pirocalciferolii (Fig. 2.16 şi 2.17)*.

Toate transformările au loc la nivelul ciclului II(B), care antrenează şi unele modificări la nivelul ciclului I (A): trecerea —CH_3 din 10 din poziţia β în α, cu formarea *lumisterolilor*: ergolumisterol sau lumisterol$_2$; colelumisterol sau lumisterol$_3$ etc.; ruperea ciclului II(B), cu formarea *secosterolilor*, cu trei cicli faţă de patru cicli ai provitaminelor: *tachisterolul (Windaus)* şi *precalciferolul (Velluz)*, în echilibru cu *lumisterolul*; precalciferolii sînt instabili şi, prin simplă încălzire, suferă o rearanjare a dublelor legături cu apariţia unei grupări = CH_2 în 10, care reprezintă chiar vitaminele D: *ergocalciferolul* sau *vitamina* D_2; *colecalciferolul* sau *vitamina* D_3 etc.; prin continuarea iradierii se formează un

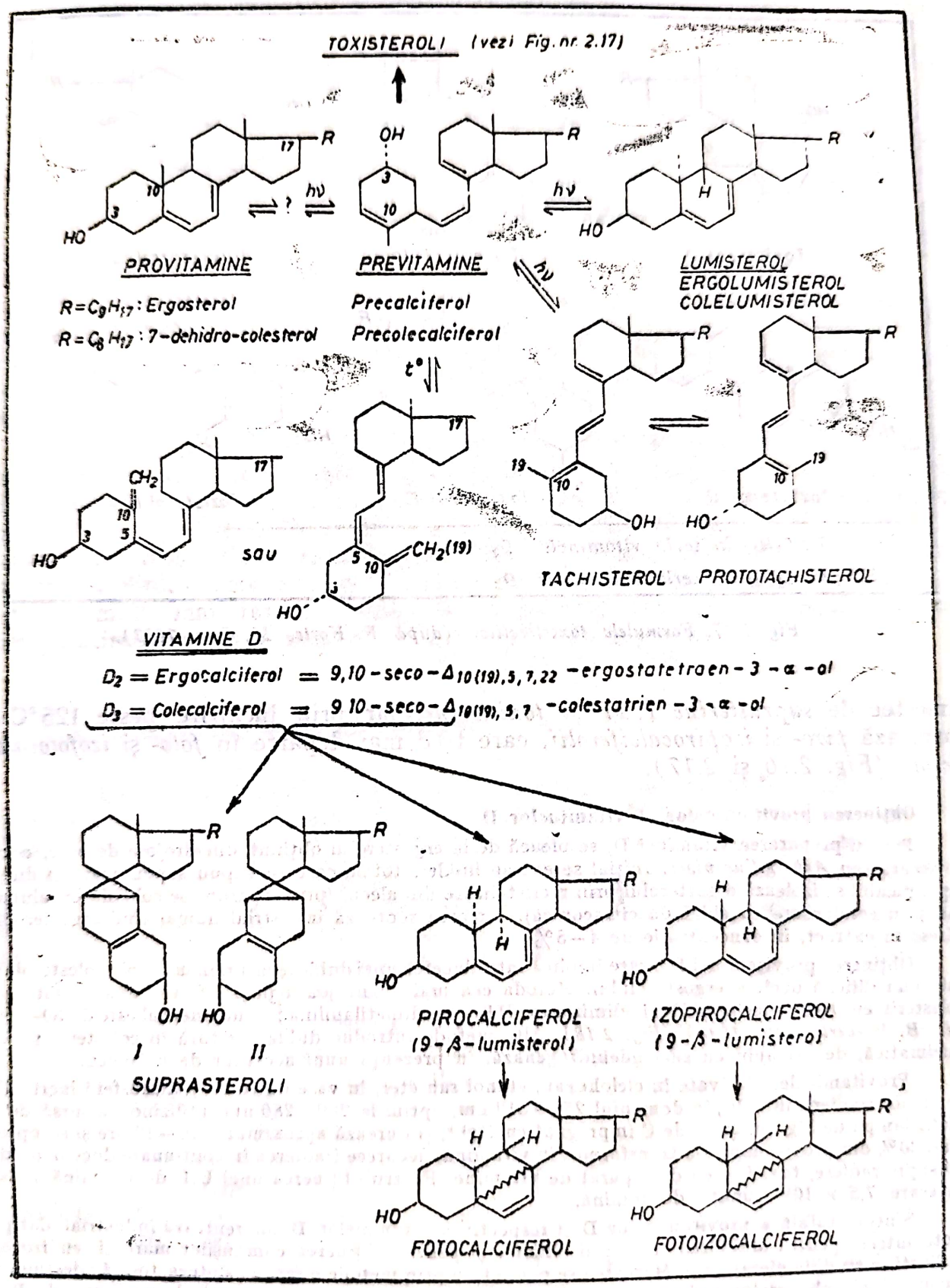


Fig. 2.16. Transformarea fotochimică a provitaminelor D în vitamine (Vitaminele D sînt —3—α-ol).

Scanned with OKEN Scanner

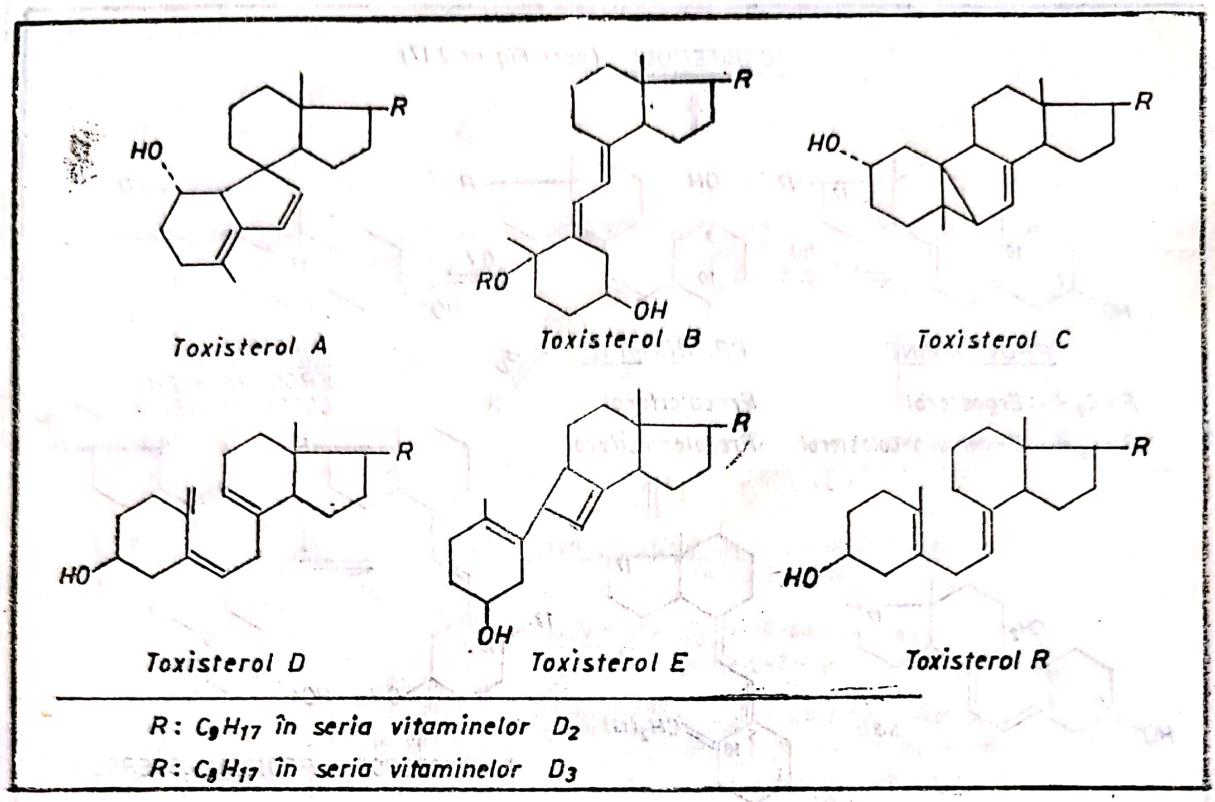


Fig. 2.17. Formulele toxisterolilor (după F. Korte, M. Goto, 1977).

amestec de *suprasterine I, II* și *toxisterine*, iar prin încălzire peste 125°C se formează *piro-* și *izopirocalciferolii*, care trec mai departe în *foto-* și *izofotocalciferoli (Fig. 2.16* și *2.17)*.

Obținerea provitaminelor și vitaminelor D

Pentru prepararea vitaminei D_2 se pleacă de la ergosterolul obținut din drojdia de bere, cornul de secară sau *Aspergillus niger*. Inițial se extrag lipidele totale care se supun saponificării și din insaponificabil se izolează ergosterolul prin recristalizare din alcool (prin separare pe coloană cu alumină sau prin condensare cu aldehidă citraconică). Izolarea rentează industrial numai cînd ergosterolii se găsesc în extract, în concentrație de 4—5%.

Obținerea provitaminei D_3, care implică introducerea unei duble legături în molecula colesterolului este mai dificilă decît a ergosterolului. Metoda cea mai avantajoasă pare a fi tratarea acetatului de colesteril cu N-Br-succinimidă și eliminarea HBr cu dimetilanilină; randamentul este de 30— 50% *(H. B. Herbert, 1946—1948) (Fig. 2.18)*. Alte metode introduc dubla legătură în colesterol pe cale enzimatică, de exemplu cu succindehidrogenază, în prezența unui acceptor de hidrogen.

Provitaminele, dizolvate în ciclohexan, etanol sau eter, în vase de cuarț și atmosferă inertă (N_2) se supun iradierii în U.V., în domeniul 256—313 nm, optim la 260—280 nm, utilizînd ca sursă de radiații lampa de Hg sau arcul de C impregnat cu Mg^{2+}, și durează aproximativ 10—12 ore și se oprește cînd 20% din provitamină s-a transformat în vitamină, deoarece iradierea în continuare duce la produși de suprairadiere, toxici, greu de separat de vitamine. Pentru obținerea unei U.I. de vitamină D sînt necesare $7{,}5 \times 10^{18}$ cuante de lumină.

Sinteza totală a provitaminelor D și respectiv a vitaminelor D nu rentează industrial, dar prezintă interes pentru stabilirea structurii chimice și pentru obținerea compușilor marcați (cu izozopi) utilizați în studiile metabolice. Marcarea se poate face prin metode diferite: sinteza totală; deschiderea ciclului I al colesterolului și reciclizare după încorporarea C marcat, urmată de iradiere *(J. P. L. Bots, 1952)*; Deoarece aceste metode sînt laborioase și puțin rentabile se recurge de obicei la metodele de biosinteză, utilizînd acetatul marcat în mediul de cultură al levurilor, care sintetizează ergosterolul *(E. Kodicek, 1955)*.

Scanned with OKEN Scanner

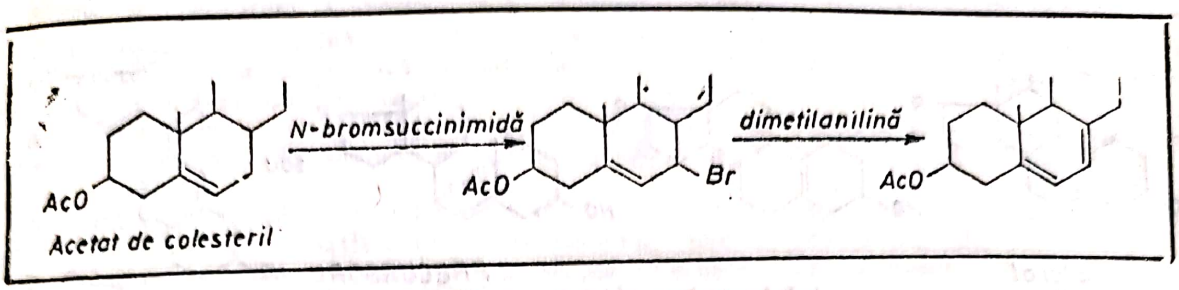


Fig. 2.18. Sinteza 7-dehidrocolesterolului

Proprietățile produșilor intermediari și de suprairadiere sau încălzire. Precalciferolii au o activitate similară cu a vitaminelor corespunzătoare; *izopirocalciferolii și suprasterinele I, II* sînt lipsiți de activitate *(Inhoffer, 1954)*, iar *toxisterinele*$_2$ (compusul 248), lipsite de activitate; în doze de 100 μg sînt toxice, manifestînd efecte puternice hipercalcemiante.

Dintre produșii de hidrogenare, *secostanolul* (complet hidrogenat) nu prezintă interes special, în schimb, *tachisterolul* (de 500 de ori mai puțin activ decît vitamina D) se transformă prin hidrogenare parțială în *ergohidrotachisterol* sau *compusul AT*$_{10}$ *(Fig. 2.19)*. Acesta are un efect de creștere a nivelului calciului sanguin la animalele paratiroidectomizate *(Van der Vliet Jr., 1948)* și este utilizat în clinică, deoarece are, față de hormonii paratiroidieni, avantajul de a acționa mult mai rapid, condiție de un deosebit interes în combaterea tetaniei paratireoprive care necesită o intervenție de urgență.

2.1.3.1.2. ACTIVĂRI NONFOTOCHIMICE

Prin tratarea colesterolului la cald cu „floridină" (argilă de Florida) și respectiv cu oxid de Al și hidroxizi alcalini se obțin produși cu *activitate antirahitică (Fig. 2.20)*, de exemplu, *„cetona 250"* (denumire provenită din absorbția maximă la 250 nm), care se poate obține și din vitamina D$_3$; în prezența ionilor de Ca^{2+} formează un complex chelat (cu maximul de absorbție la 262 nm) cu activitate antirahitică similară vitaminei D$_3$.

Considerîndu-se că activitatea se datorește radicalilor acizi, s-a urmărit efectul acidului sulfuric asupra colesterolului, obținîndu-se *acidul 1,3,5,7-colestantetraen-3-sulfuric* și alți intermediari cu activitate slabă, dar care pot fi „activați" în continuare, obținîndu-se compusul de tip *„bisteroid,"* foarte activ (300.000 U.I./g); prin oxidare se obțin produși de 10—100 ori mai puțin activi, cu excepția „cetonei-250" menționate *(Joder și colab., 1936, 1949; R. Doulon, J. Chopin; Y. Raoul și colab., 1951—1963)*.

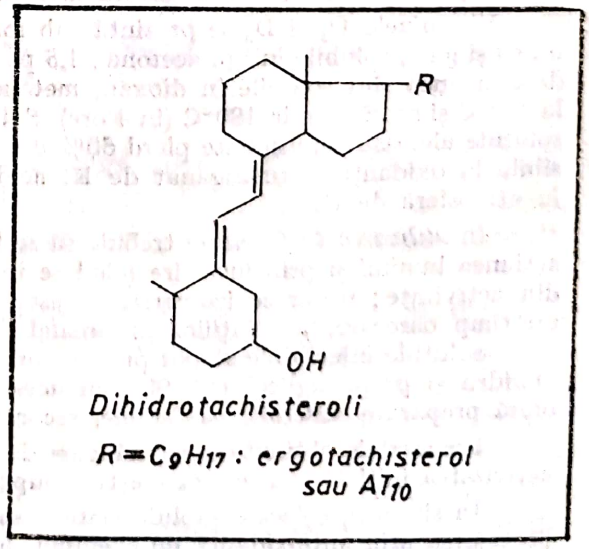


Fig. 2.19. Formula dihidrotachisterolului (AT_{10})

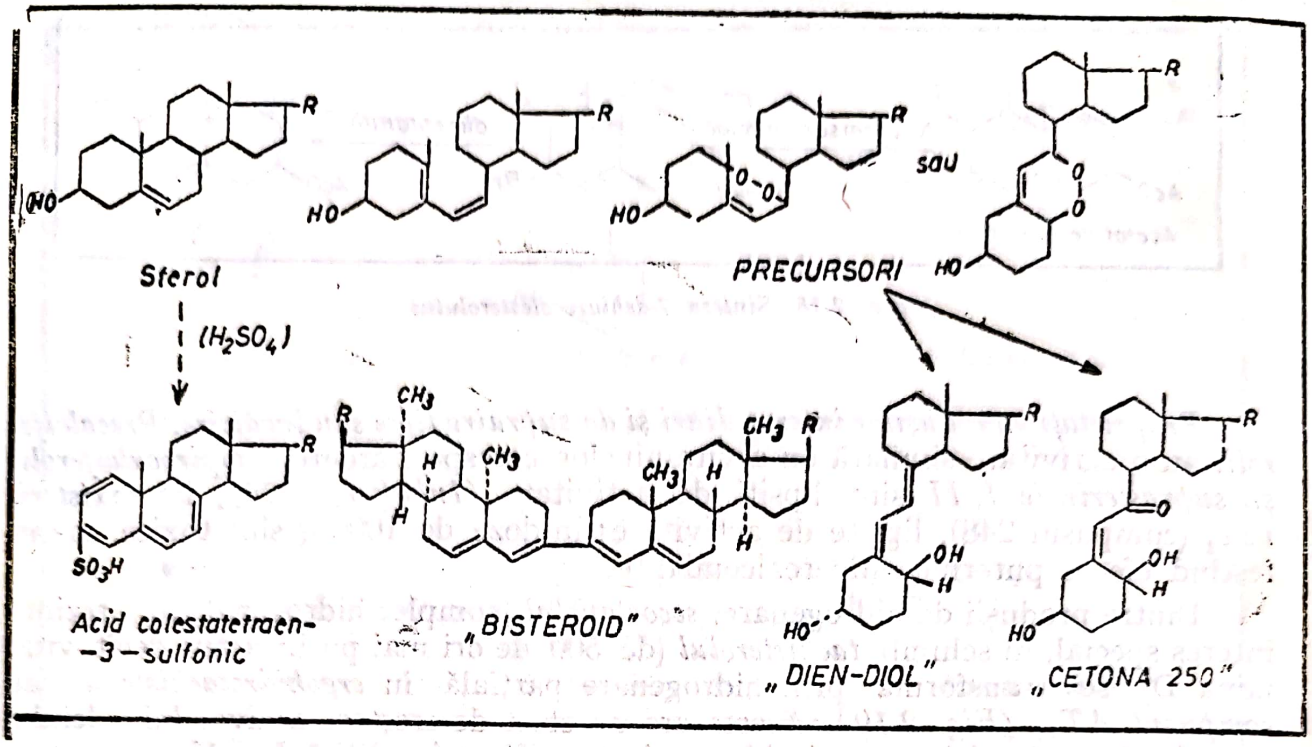


Fig. 2.20. Transformarea nonfotochimică a provitaminelor D

2.1.3.2. *CALCIFEROLII. VITAMINELE D. VITAMINELE ANTIRAHITICE*

2.1.3.2.1. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE ȘI METODE DE DOZARE

F.R. IX prevede *Ergocalciferolum* (vitamina D_2) cu p.t. 115—118°C, și *Colecalciferolum* (vitamina D_3 numită și Viosterol) cu p.t. 84—85°C. 1.U.I. = = 0,025 μg colecalciferol (1 mg = 40.000 U.I.; 1 μg = 40 U.I.).

Vitamina D_4 sau dihidroergocalciferolul (p.t. 180°C), vitamina D_5 sau sitocalciferolul (p.t. 144—145°C) și vitamina D_6 sau stigmacalciferolul (p.t. 154°C) nu sînt oficinale.

Vitaminele D_2 și D_3 se prezintă sub formă de cristale incolore sau pulbere cristalină albă, fără miros și gust, solubile în l.p. acetonă; 1,5 p. eter; 1,5 p. cloroform; 25 p alcool; 100 p. uleiuri grase; de asemenea sînt solubile în dioxan, metanol, dar practic insolubile în apă. Ele rezistă la încălzire la 100°C și se distrug la 180°C (în 4 ore). Soluțiile uleioase la 0°C pierd 50% din activitate în 3 ani; soluțiile uleioase emulsionate pierd 50% din activitate în 3 săptămîni și 90% după 6 luni. Fiind sensibile la oxidanți (permanganat de K, acid cromic etc.) și chiar la oxigenul din aer, se păstrează în atmosferă de N_2.

În *utilizarea în farmacie* trebuie să se țină seama de degradarea rapidă a colecalciferolului sub acțiunea luminii și prin încălzire (cînd se izomerizează la precolecalciferol care posedă numai 35% din activitate; deoarece izomerizarea este reversibilă la răcire se recomandă păstrarea la frigider, un timp oarecare, a soluțiilor în prealabil încălzite).

Soluțiile injectabile se pot prepara prin dizolvarea în uleiuri vegetale sau în amestec de etanol anhidru și propilenglicol (10 : 90); în aceste condiții suportă autoclavarea în atmosferă de azot și oferă preparate miscibile cu laptele, recomandate în administrarea orală la copii.

Preparatele obținute prin adăugare de pulberi minerale sau emulsionate pierd o mare parte din activitatea inițială, din cauza creșterii suprafeței de contact cu aerul.

În siropuri, colecalciferolul poate fi solubilizat cu ajutorul polisorbatului 80, dar este necesară protejarea prin antioxidanți, de exemplu, butilhidroxitoluen, galat de etil, asociate cu acid ascorbic sau citric *(H. Nerlo și colab., 1968) (din V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Metode de identificare și dozare:

- Dozarea în U.V. la 265 nm, pentru vitamine și provitamine.
- Soluția cloroformică tratată cu acid sulfuric dă 2 straturi: cel cloroformic, roșu, cel acid, cu fluorescență verde (metoda *Salkovski*);
- Soluția alcoolică (în prezență de puțină apă) dă cu acidul sulfuric o coloratie portocalie, ce trece în roșu, la zona de contact: reacția este pozitivă pentru ergocalciferol (diferențiere de vit. D_3);
- Soluția cloroformică, cu anhidridă acetică și acid sulfuric dă o gamă de culori: roz, violet, albastru și în final verde (reacția *Liebermann-Burchard*, generală pentru steroli);
- Soluția alcoolică în prezența $AlCl_3$ și pirogalolului dă o coloratie violetă);
- Soluția cloroformică dă cu $SbCl_3$ o coloratie galben-portocalie (sensiblitatea de 0,02—0,04 mg), mascată de vitamina A (albastră).
- În prezența clorurii de acetil și $ZnCl_2$, provitaminele dau o coloratie roșie (sensibilitatea 1: 20.00) și vitaminele, verde.

Prezența unor compuși străini deraiază reacțiile de culoare, de aceea este necesară îndepărtarea lor (tachisterolii, prin coloană cu anhidridă maleică; acizi grași nesaturați, prin saponificare, alți steroli prin precipitare cu digitonină), după care se aplică reacția $SbCl_3$ *(E. J. Mulder și colab., 1957);*

- Cromatografierea vitaminei dizolvate în eter pe hîrtie de filtru impregnată cu „Nujol" (separare de „cetona-250");
- Testele *biologice* urmăresc prevenirea sau vindecarea rahitismului la diferite specii. La puiul de găină rahitismul se instalează prin simpla carențare în vitamină D; șobolanul necesită, în plus, și alterarea raportului Ca/P alimentar (prin adăugarea de $CaCO_3$ 2% în alimente) și păstrarea animalelor la întuneric. La animalele carențate se urmărește gradul de calcefiere a regiunii epifizare a tibiei; radiologic: prin impregnarea oaselor cu $AgNO_3$ sau „Line-Test"; prin cîntărirea cenușii obținute prin incinerarea oaselor (cantitatea de substanțe minerale a femurului ciinilor tineri este de aproximativ 46%, la cei rahitici de numai 28%);
- Dintre metodele *biochimice*, dozarea fosfaților anorganici din sînge arată scăderea la jumătate la animalele sau copiii rahitici;
- Cea mai utilă metodă pentru clinica umană este dozarea *fosfatazelor alcaline* din sînge, care cresc de 2—5 ori la persoanele cu rahitism, fiind primul semn care apare, înaintea manifestărilor clinice, și ultimul care dispare, după vindecarea bolii; la unele animale (la șobolani) nu se înregistrează asemenea modificări.
- *Testele clinice* stabilesc necesarul de vitamină care permite retrocedarea și dispariția semnelor biochimice, radiologice și clinice, cu excepția leziunilor avansate și stabilizate *(H. Gounelle, C. Marnay, 1965)*.

În determinările biologice trebuie să se țină seama că efectul diferitelor vitamine prezintă variații între specii. Astfel, vitamina D_3 este de 25 de ori mai eficientă decît vitamina D_2 la puiul de găină (de aceea nu sînt indicate pentru determinări care urmează a fi transpuse la om); pe șobolani, vitamina D_3 are 1/2, D_4: 1/10 și D_5: 1/20 din activitatea vitaminei D_2; la om, cele mai active sînt vitaminele D_3 și D_2, considerate cu efecte echivalente.

2.1.3.2.2. METABOLISMUL PROVITAMINELOR ȘI VITAMINELOR D. ACTIVĂRI „PRIMARE"

Necesitățile umane sînt asigurate prin provitamine, care se transformă în vitamine printr-o activare „primară" în stratul bazal al pielii, cu ajutorul razelor U.V., cu lungime mare de undă, și prin vitaminele, elaborate de către alte specii de animale.

Ierbivorele primesc prin alimentație numai provitamine, iar carnivorele, vitamine; pisica elimină o parte din vitamină prin glandele sebacee (blană) și prin „toaleta" pe care și-o face asigură reintrarea în organism a unei părți de vitamină; la fel, păsările transformă provitaminele în vitamine la nivelul penelor. Peștii au, dintre toate speciile, cel mai bogat depozit de vitamină D în ficat *(A. F. Hess, M. Weinstoch, 1926; J. C. Drummond, E. R. Gunther, 1930)*, deși, aparent ei nu ar putea transforma provitaminele pe care le iau din fitoplancton în vitamine, deoarece la adîncimea la care trăiesc (în mări, oceane)

Scanned with OKEN Scanner

nu pătrund razele U.V.; pentru explicarea acestei neconcordanţe s-a recurs la ipoteza activării prin razele „mitogenetice" (radiaţii care s-ar produce în celule în timpul creşterii, descoperite de *A. G. Gurvici, 1923)*, sau prin reacţii enzimatice, dar problema nu este clarificată.

Omul primeşte, pe lîngă vitaminele elaborate (din alimentele de origine animală) şi provitamine, în special 7-dehidrocolesterol, destul de răspîndit (4,5% din totalul sterolilor din gălbenuşul de ou şi grăsimea de porc şi 0,7% din sterolii grăsimilor de vacă). În prezent se admite că această provitamină se formează şi în mucoasa intestinală, unde concentraţia 7-dehidrocolesterolului reprezintă 7% din cea a colesterolului, considerîndu-se astfel că organismul uman este capabil să-şi asigure, singur, într-o mare măsură necesităţile de provitamine şi, respectiv, vitamine (fără aport obligatoriu alimentar), în condiţiile integrităţii proceselor de activare „primară" şi „secundară" şi a cerinţelor normale. În consecinţă, pentru om sînt caracteristice provitaminele şi vitaminele D_3; provitamina D_2 apare în cantităţi mici (din vegetale, levuri) şi, la fel, şi vitamina D_2 (de la animalele care au transformat provitamina D_2 în vitamină (vaci, peşti etc.); cantităţile infime de vitamine D_4—D_6 apar în organismul uman prin intermediul animalelor hrănite cu drojdie iradiată.

Resorbţia provitaminelor şi vitaminelor D are loc la nivelul intestinului subţire, necesitînd prezenţa bilei şi a lipidelor alimentare *(N. B. Tayleur, 1935; C. Heymans, 1957)*. Gradul de resorbţie se apreciază la 95% din aportul alimentar, deşi unii susţin valori mai mici, pe baza pierderilor prin fecale a aproximativ 30% dintr-o doză de vit. D marcată (în 24 ore), dar, probabil, aceste date nu ţin seama suficient de circuitul enterohepatic al vitaminelor D. Alterarea resorbţiei, prin administrarea uleiului de parafină (care nu se absoarbe) sau infecţiile intestinale cresc pierderile prin fecale şi pot duce la rahitism. În timpul absorbţiei, provitaminele şi vitaminele se încorporează în chilomicroni, transportaţi pe cale limfatică, proces care durează 6—8 ore. În sînge, sînt vehiculate de α_2-globulinele, transportoare specifice, şi mai puţin de α_1-globuline *(H. G. Morgan, W. C. Thomas şi colab., 1958—1969)*. *Vitaminemia D* se cifrează la 50—165 U.I. (după anotimp), în medie 100 U.I./100 ml ser. După o doză mare de vit. D (600.000 U.I.), vitaminemia poate atinge valori foarte ridicate (peste 10.000 U.I./100 ml sînge). Eliberarea $^{14}C_3$-colecalciferolului din depozit intramuscular (muşchiul pectoral al puiului de găină) este foarte lentă şi durează 7 luni (Rots, 1952, 1957), ceea ce concordă cu datele din clinica umană care relevă că dozele mari unice asigură necesităţile pentru 3—4 luni. O oarecare depozitare se face în ficat, unde vitamina D este esterificată cu acizi graşi, în proporţie de 10% *(D.R. Fraser, E. Kodicek, 1965—1968)* şi unde este supusă proceselor de activare, prin hidroxilare. Eliminarea se face, parţial, prin fecale şi piele, sub formă de vitamină şi metaboliţi. Urina este lipsită de vitamină D, cu excepţia unor cazuri patologice, de exemplu, afecţiunile renale (nefroze).

2.1.3.2.3. ACTIVAREA „SECUNDARĂ". SISTEMUL VITAMINELOR D

Semnalarea unui timp „mort" între momentul administrării vitaminei D şi înregistrarea efectelor biologice în transportul activ al calciului *(A. Carlson, 1954)* şi urmărirea metabolizării vitaminelor D_2—D_4 marcate, converg spre concepţia că vitaminele D ca atare nu sînt formele active în organism şi că ele necesită activări „secundare", prin procese de hidroxilare suplimentară, în ficat şi

apoi în rinichi *(J. Lund; H. F. De Luca; Y. Tanake; M. F. Holich; M. B. Clark; J. W. Blunt; R. Gray; J. Boyle; N. Colston etc., 1966—1979) (Fig. 2.21)*.

Transformarea colecalciferolului (vitamina D_3) la derivatul metabolic activ este inițiată printr-o hidroxilare la nivelul *ficatului* cu formarea *25-hidroxicolecalciferolului* sau *25—OH—D_3*. Enzima este localizată în „microzomi", adică în reticulul endoplasmatic neted (REN) și necesită NADPH, O_2 și ioni de Mg^{2+}; necesitatea citocrom P_{450} este, în acest caz, discutabilă, deoarece procesul nu este inhibat prin CO și/sau alți inhibitori ai acestui citocrom. 25—OH—D_3, legată de o proteină transportoare specifică (cu gr.mol. 52.000, implicată și în transportul altor metaboliți ai vitaminei D) reprezintă forma majoră din circulație (30 ng/ml), față de vitamina D_3 ca atare, care se găsește în cantități mai mici (5 ng/ml); aceasta poate chiar lipsi din sînge, cu excepția perioadelor cînd se sintetizează în piele sau cînd se absoarbe din intestin *(H. F. De Luca, 1978)*. 25—OH—D_3 nu acționează, de obicei, direct, asupra nici unui țesut țintă, ci necesită o nouă hidroxilare.

Convertirea 25—OH—D_3 la metabolitul activ, *1α, 25-dihidroxicolecalciferol* sau *1,25—$(OH)_2$—D_3* are loc la nivelul *rinichiului*, printr-un mecanism de hidroxilare similar steroidgenezei din corticosuprarenale, cu ajutorul unui sistem enzimatic localizat în membrana internă a mitocondriei, ce cuprinde: NADPH, o flavoproteină (fier-redoxin-reductaza), o proteină cu Fe și S (fier-redoxina renală) și cit. P_{450} specific. 1,25—$(OH)_2$—D_3 este vehiculată, legată de proteinele transportoare ale vitaminei D și metaboliților săi, la nivelul intestinului, unde declanșează procesele implicate în absorbția calciului.

Nefrectomia anulează complet formarea 1,25—$(OH)_2$—D_3 și inhibă răspunsul intestinului la dozele fiziologice de vitamina D_3, sau de 25—OH—D_3, dar nu afectează răspunsul la 1,25—$(OH)_2$—D_3 administrat ca atare; uremia, indusă prin ligaturarea uretrei, nu afectează formarea 1,25—$(OH)_2$—D_3 și nici răspunsul intestinului la 25—OH—D_3. Rezultă astfel că formarea 1,25—$(OH)_2$—D_3 este dependentă de integritatea țesutului renal și că stă sub controlul unor factori fiziologici: cantitatea calciului alimentar, nivelul calcemiei, secreția hormonilor paratiroidieni etc.

Se consideră că 25—OH—D_3 inj.i.p. este de 4—5 ori mai activă decît vit. D_3 în prevenirea rahitismului; 1,25—$(OH)_2$—D_3 este de 20—30 ori mai eficientă decît vit. D_3 în transportul intestinal al Ca^{2+} și, respectiv, în prevenirea rahitismului, și de 10 ori mai activă în menținerea nivelului P anorganic sanguin la animalele cu regim sărac în fosfați *(A. W. Norman, 1968; H. F. De Luca, 1973; Y. Tanaka, H. Frank, H. F. De Luca, 1973)*.

În rinichi, se formează și 24, 25—$(OH)_2$—D_3, mai puțin activă decît 1,25—$(OH)_2$—D_3 în efectele „clasice" (transportul intestinal al Ca^{2+}, procese de mineralizare), dar capabilă să crească nivelul Ca^{2+} seric la șobolanii cu depletiție de fosfați vitamin-D-dependentă; administrată *per os*, simultan cu 1,25—$(OH)_2$—D_3 este mai eficientă, decît 25—OH—D_3 sau 1,25—$(OH)_2$—D_3 singură, în vindecarea osteomalaciei persoanelor deficiente în vitamina D; alături de 1,25—$(OH)_2$—D_3 este necesară pentru ecloziune și dezvoltarea puilor de găină *(J. T. Boyle, R. W. Gray, H. F. De Luca, 1971; H. L. Henry, A. W. Norman, 1978)*.

Scanned with OKEN Scanner

Exercitarea efectelor biochimico-fiziologice ale vitaminelor D implică, în mod real, un grup de compuşi strîns corelaţi între ei printr-o filiaţie de reacţii metabolice ce se desfăşoară în organism:

PROVITAMINE D $\xrightarrow[\text{(u.v. în piele)}]{\text{activare „primară”}}$ VITAMINE D $\xrightarrow[\text{(ficat)}]{\text{1—a activare „secundară”}}$

→ DERIVAŢI OH—D $\xrightarrow[\text{(rinichi)}]{\text{a 2-a activare „secundară”}}$ DERIVAŢI $(OH)_2$—D *(Fig. 2.16 şi 2.21)*

Unele particularităţi, ca de exemplu, acoperirea necesităţilor fără aport exogen, prin biogeneză proprie, activarea obligatorie prin procese metabolice reglate prin mecanisme *feed-back* şi modul de acţiune biochimică, prin derepresarea genelor şi formarea unor proteine specifice, contravin în mare măsură noţiunii de „vitamină”, dar corespund integral comportării hormonilor (steroizi) şi au condus la ideea că vitamina D este un hormon, mai mult decît o vitamină. Considerăm că este mai utilă cuprinderea tuturor compuşilor cu acţiuni specifice implicaţi în procesele vitamin-D-dependente sub denumirea de *„sistemul vitaminelor D”*.

2.1.3.3. *ROLUL „SISTEMULUI VITAMINELOR D” ÎN PROCESELE METABOLICE ŞI ÎN FUNCŢIILE ŢESUTURILOR ŞI ORGANELOR*

2.1.3.3.1. ROLUL ÎN METABOLISMUL CALCIULUI ŞI A FOSFAŢILOR

Acţiunea principală a „sistemului vitaminelor D” este *reglarea concentraţiei şi a raportului calciu/fosfaţi* şi, respectiv *mineralizarea osului*, la nivele şi prin mecanisme diferite.

Absorbţia calciului. Observaţia că animalele carenţate în vitamină D pierd cantităţi excesive de calciu prin fecale *(Orr şi colab., 1928)* a fundamentat concepţia că vitamina D este esenţială pentru absorbţia intestinală a calciului *(R. Nicolaysen, 1930)*. Cercetările cu Ca stabil *(R. Nicolaysen, 1951)* şi cu izotopi ai Ca *(B. B. Micicovsky, A. M. Nielsen, 1951; B. Lindquit, 1952)* au relevat că vit. D asigură concentraţia şi raportul Ca^{2+}/fosfaţi favorabile absorbţiei intestinale; fluctuaţiile fosfaţilor fiind dependente de ale calciului, se consideră că ei trec „legaţi” de calciu *(B. Jeanraud, 1961)*.

Mecanismul de acţiune biochimică a 1,25$(OH)_2$—D_3. Transportul activ al Ca^{2+} la nivelul „bordurii în perie” a intestinului este dependent de formele activate, în special de 1,25—$(OH)_2$—D_3 şi nu de vitaminele D ca atare, cu implicarea unui mecanism de control a informaţiei genetice, similar cu acela al hormonilor steroizi, prin „demascarea” genelor de pe ADN, cu formarea m-ARN, care induce biosinteza unor proteine transportoare de calciu, mecanism susţinut prin observaţia că inhibitorii sintezei proteinelor (de exemplu, Daunomicina) scad nivelul absorbţiei calciului.

Cercetările *in vivo* şi cu *saci intestinali* relevă că vitamina D stimulează, în aceeaşi măsură, transportul Ca^{2+} de la mucoasă spre seroasă şi invers, dar, fluxul normal dinspre suprafaţa mucoasei spre seroasă excede de 5—10 ori pe cel în sens invers şi, în consecinţă, favorizează *absorbţia* Ca^{2+}; acest transport

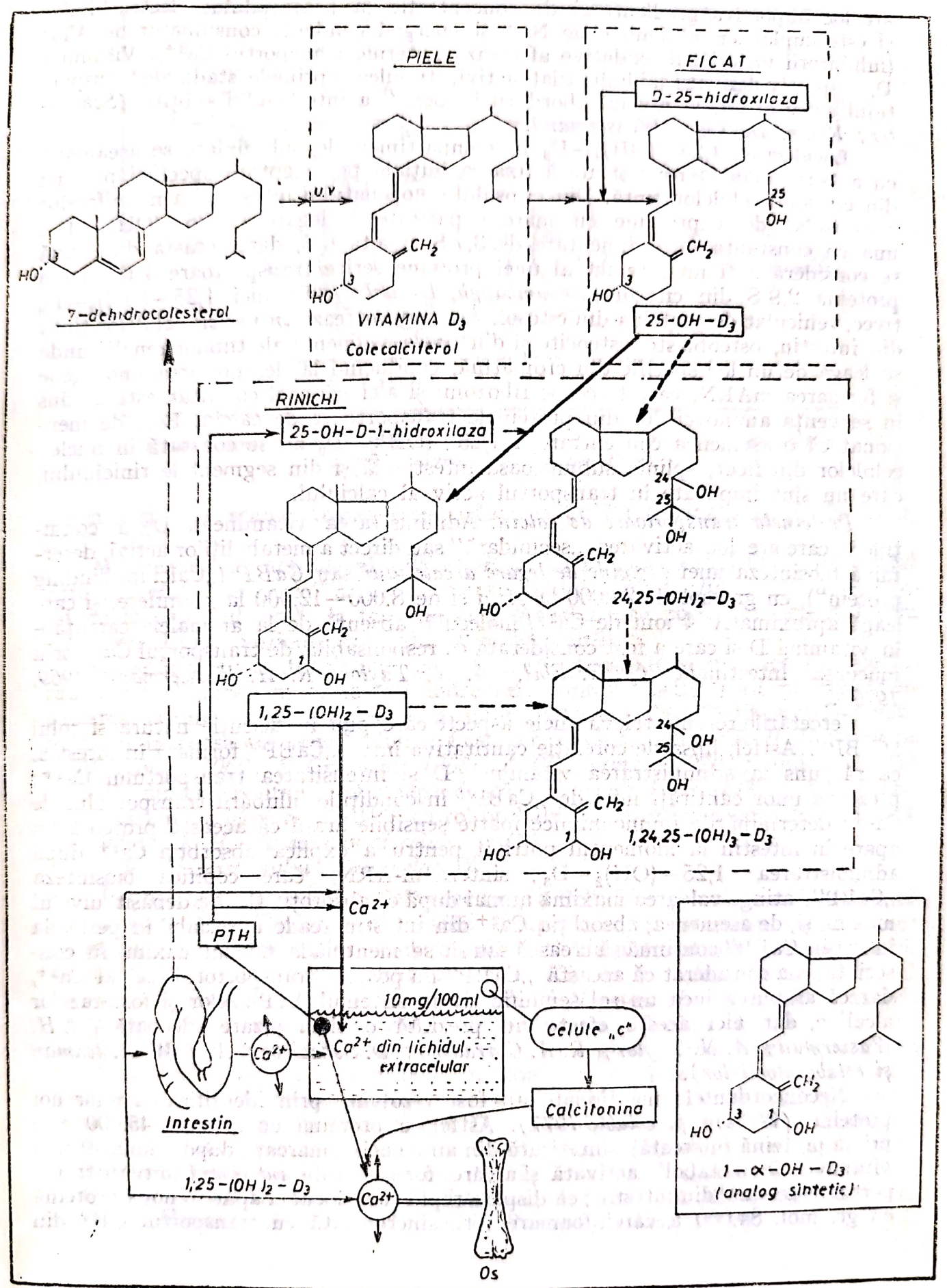


Fig. 2.21. Căile, formele şi locurile de „activare" ale colecalciferolului (după H. F. DeLuca, 1975; F. Korte, M. Goto, 1977) (PTH = parathormon).

are loc împotriva gradientului de concentraţie (a potenţialului electrochimic) şi este cuplat cu al ionilor de Na^+ şi energodependent, consumator de ATP (inhibitorii fosforilării oxidative afectează puternic transportul Ca^{2+}). Vitamina D, respectiv derivaţii săi hidroxilaţi activi, stimulează primele stadii ale transportului activ al Ca, la nivelul „bordurii în perie" a intestinului subţire *(Schachter; Rosen, De Luca, Wasserman)*.

Localizarea $1,25-(OH)_2-D_3$ în compartimentele subcelulare se aseamănă cu a hormonilor steroizi şi arată fixarea iniţială pe receptorii specifici proteici din citosolul celulelor ţintă. Din citosolul omogenatului intestinal a mamiferelor s-au izolat două proteine cu mare capacitate de legare a $1,25-(OH)_2-D_3$: una cu constanta de sedimentare de 3,7 S şi alta 6 S, dar, aceasta din urmă se consideră a fi un artefact al unei proteine serice transportoare 4,1 S cu o proteină 2,9 S din citosol *(Braumbangh, Haussler)*. De aici $1,25-(OH)_2-D_3$ trece, vehiculat de proteina din citosol, şi se concentrează *în nucleii* celulelor ţintă din intestin, osteoblaste, osteocite şi din unele segmente ale tubilor renali, unde se leagă de un loc specific din cromatină, conducînd la derepresarea unor gene şi formarea mARN, care trece pe ribozomi şi aici mesajul codificat este tradus în secvenţa aminoacizilor din proteinele transportoare de calciu. Este de menţionat că o asemenea concentrare a $1,25-(OH)_2-D_3$ nu se constată în nucleii celulelor din ficat, splină, submucoasa intestinală şi din segmentele rinichiului, care nu sînt implicate în transportul activ al calciului.

Proteinele transportoare de calciu. Administrarea vitaminelor D, în condiţiile în care are loc activarea „secundară" sau direct a metaboliţilor activi, determină biosinteza unei *proteine de legare a calciului* sau *CaBP* („Calcium-binding protein"), cu gr. mol de 24.000 la găini şi de 8.000—12.000 la mamifere, şi care leagă aproximativ 4 ioni de Ca^{2+}/ moleculă, absentă de la animalele carenţate în vitamină D şi care a fost considerată ca responsabilă de transportul Ca^{2+} prin mucoasa intestinală *(J. G. Ebel, A. N. Taylor, R. H. Wasserman, 1969, 1970)*.

Cercetările recente relevă unele aspecte care pun în discuţie natura şi rolul „CaBP". Astfel, lipsa de corelaţie cantitativă între „CaBP" formată în intestin, ca răspuns la administrarea vitaminei D şi intensitatea transportului Ca^{2+}; prezenţa unor cantităţi mici de „CaBP" în condiţiile inhibării transportului de Ca^{2+}; determinările imunochimice foarte sensibile arată că această proteină nu apare în intestin la momentul potrivit pentru a explica absorbţia Ca^{2+} după administrarea $1,25-(OH)_2-D_3$; sinteza m-ARN, care codifică biosinteza „CaBP", atinge valoarea maximă numai după ce absorbţia Ca^{2+} a depăşit nivelul maxim, şi, de asemenea, absorbţia Ca^{2+} din intestin scade apreciabil în perioada în care „CaBP" continuă să crească sau să se menţină la nivelul maxim. În consecinţă, s-a considerat că această „CaBP" nu poate fi transportorul real al Ca^{2+}, dar că ar putea juca un rol semnificativ în sistemul ATP-azelor şi fosfatazelor alcaline, dar nici aceste efecte nu prezintă o sincronizare adecvată *(R. H. Wasserman; A. N. Taylor; R. A. Corradino; D. Schachter; A. J. W. Hitchman şi colaboratorii lor)*.

Neconcordanţele menţionate au fost rezolvate prin identificarea unor noi proteine *(Willson şi colab., 1977)*. Astfel, o proteină cu gr. mol. 45.000 este prima proteină (marcată) sintetizată din aminoacizii marcaţi, după administrarea vitaminei D metabolic activată şi a cărei formare este *anterioară* iniţierii transportului de Ca^{2+} din intestin; ea dispare rapid şi în locul ei apare o nouă proteină cu gr. mol. 84.000 a cărei formare este sincronizată cu transportul Ca^{2+} din

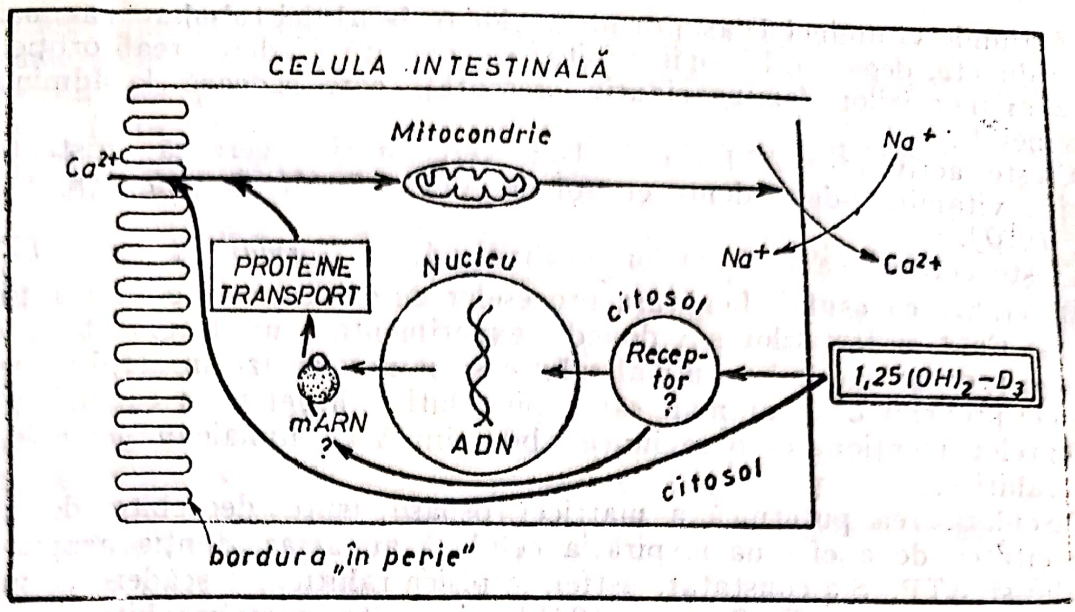


Fig. 2.22. Ipoteze asupra efectelor 1,25—$(OH)_2$—D_3 în absorbţia intestinală a calciului (după H. F. DeLuca, 1975)

intestin şi care scade progresiv cu reducerea Ca^{2+} intestinal *(H. F. De Luca, 1978—1979)*.

Mecanismul de acţiune al 1,25—$(OH)_2$—D_3 în transportul Ca^{2+}, în special prin suprafaţa „în perie" a mucoasei intestinului subţire *(fig. 2.22)*, este corelat cu transportul Na^+; la terminarea procesului este posibil transportul prin intermediul unor vezicule sau chiar al mitocondriilor.

Cercetările cu ajutorul unor metode foarte sensibile şi specifice (în special radioimunochimice, cu antiseruri îndreptate contra „CaBP") au permis identificarea, la diferite specii animale, a unor proteine „CaBP"-vitamin-D-dependente în mucoasa duodenală, rinichi, ficat, ser, tiroidă, creier *(R. H. Wasserman, A. N. Taylor, 1966; S. Cristakos, 1968; A. W. Norman, 1978)*; unii consideră „CaBP" din creier vitamin-D-independentă *(H. F. De Luca, 1979)*; în oviductul păsărilor s-a găsit o „CaBP", cu rol probabil în calcefierea cojii oului *(R. A. Corradino, R. H. Wasserman şi colab., 1971)*.

Efectele „sistemului vitaminelor D"

În absorbţia intestinală a Ca^{2+} precum şi a Sr^{2+}, Ba^{2+} şi a altor cationi *(R. H. Wasserman, A. N. Taylor, 1969)*. Unii compară acest mecanism cu creşterea permeabilităţii membranelor celulare exercitată de antibioticele polienice, ca de exemplu, *Nistatina, Amfotericina B (S. C. Kinsky şi colab., 1962—1968; G. Lessa, G. Weissman, 1968; R. G. Wong, R. W. Norman şi colab., 1970;* asupra mecanismului de acţiune a se vedea, *D. Bedeleanu, M. Kory, 1976)*.

Vitamina D manifestă efecte bimodale în reglarea proceselor implicate în economia fosfaţilor: la concentraţii fiziologice şi în doze terapeutice adecvate menţinerii acestora, creşte resorbţia din tubii renali şi deci scade excreţia fosfaţilor; în carenţa şi hipervitaminoza D, reabsorbţia fosfaţilor este scăzută şi apare fosfaturia crescută; la animalele paratiroidectomizate, vitamina D creşte clearance-ul renal şi scade fosfatemia *(E. E. Cohn, M. A. Greenberg, 1939; T. S. Danovski, 1962; S. Kowarski, D. Schachter, 1969; R. R. Mc. Gregor şi colab., 1970; S. Horowitz, A. Bar, 1972; A. H. Harper şi colab., 1979)*.

Acţiunile vitaminei D asupra proceselor reabsorbţiei tubulare par mai generale şi directe, deoarece la copiii rahitici se constată scăderea reabsorbţiei tubulare a aminoacizilor (aminoacidurie crescută), care cedează la administrarea vitaminei D.

Creşte activitatea ATP-azelor. Unii cercetători sugerează existenţa unei proteine vitamin-D-dependente cu rol de ATP-ază *(M. Z. Melancon, H. F. De Luca, 1970)*.

Creşte activitatea fosfatazelor alcaline *(A. W. Norman şi colab. 1970)*

Mineralizarea osului. Legătura proceselor de osificare cu concentraţiile normale ale Ca^{2+} şi fosfaţilor s-a dovedit experimental: un fragment de cartilaj osificabil provenit de la un animal rahitic se mineralizează în serul normal, dar nu în cel provenit de la animale sau copii rahitici; la fel şi în cazul implantării fragmentelor menţionate în regiunea abdominală a animalelor normale şi respectiv rahitice.

Vascularizarea puternică a matricei osoase (spre deosebire de colagen) şi capacitatea de a efectua respiraţia celulară au atras atenţia asupra rolului citratului şi ATP. S-a constatat, astfel, la pisica rahitică, o scădere la jumătate a citratului din oase *(F. Dickens, 1941)*; şi la alte animale rahitice se observă scăderea semnificativă a raportului citrat/cenuşe de os şi normalizarea mai rapidă, după administrarea vitaminei D, a nivelului citratului decît a mineralelor (cenuşe). Adăugarea vitaminei D la omogenatele renale provenite de la animalele normale sau cu regim rahitogen reduce oxidarea citratului, fără modificarea celorlalţi intermediari ai ciclului citric şi explică astfel creşterea citratului din os şi alte ţesuturi sub efectul calciferolului *(H. F. De Luca şi colab., 1957)*. Adăugarea vitaminei D la preparatele mitocondriale *in vitro* are acelaşi efect, de inhibare a oxidării citratului, fără alterarea fosforilării oxidative; pe cartilaje izolate, atît activitatea citrogenazei (enzima implicată în sinteza citratului) cît şi cantitatea de citrat (scăzute la animalele rahitice) cresc pînă la dublu în prezenţa calciferolului, în decurs de 2 ore. Toate acestea sugerează intervenţia vitaminei D în metabolismul citratului şi implicarea în osificare, în corelaţie cu ciclul citric şi fosforilarea oxidativă. Sistemul vitaminelor D ar participa în convertirea P organic în P anorganic, mobilizîndu-l din ţesuturi. În acest proces, intervin şi *apirazele* care descompun ATP, cu eliberarea ionului fosfat, care împreună cu Ca^{2+} formează „complexul fosfo-calcic", respectiv „sarea de os" tip apatită ce se depune pe matrice *(E. Kodicek, 1972)*. Rolul vitaminei D activate se manifestă evident şi în stimularea fosfatazelor alcaline din os, care hidrolizează esterii fosforici ai ozelor, proveniţi din sînge, şi aprovizionează astfel matricea osoasă cu ionii de fosfat necesari formării ATP. De aceea activitatea crescută a fosfatazelor alcaline indică intensificarea metabolismului osos, atît în osificare (de exemplu în consolidarea fracturilor osoase) cît şi în demineralizarea osului (rahitism fluorid, osteomalacie, tuberculoză osoasă).

Reglarea activării „sistemului vitaminelor D" şi a nivelului calciului. Dereglarea metabolismului calcic la şobolanii anefrici, la care vitamina D este fără efect, în timp ce $1,25-(OH)_2-D_3$ asigură normalizarea, indică rolul acestui metabolit în transportul activ al Ca din intestin şi în mobilizarea sa din oase.

Atît producţia hepatică de $25-(OH)-D_3$ (precursor obligatoriu), cît şi cea renală de $1,25-(OH)_2-D_3$ sînt reglate de nivelul Ca^{2+} din sînge; cînd calcemia este normală sau crescută, formarea metaboliţilor activi ai calciferolului este inhibată printr-un mecanism *feed-back* negativ, şi, invers în cazul hipocalcemiei,

cînd are loc stimularea proceselor de hidroxilare „secundară". Lipsa hidroxilazelor renale și în consecință a formării $1,25-(OH)_2-D_3$ în bolile renale este astfel incriminată în apariția hipocalcemiei intermitente, care nu cedează la vitamina D (care nu se mai activează prin deficitul hidroxilazelor renale), ci numai după administrarea $1,25-(OH)_2-D_3$.

Concepțiile actuale consideră că „sistemul vitaminelor D" exercită o acțiune generalizată și sistemică. În acest sens, pledează distribuția vitaminei D, care se găsește în mucoasa intestinală, ficat, mușchiul inimii și mușchii striați, în condrocitele proliferative, în epifizele oaselor lungi, în rinichi (concentrată în fracțiunea microzomală) etc. și unde participă în diferite procese biochimice.

Deși atît „sistemul vitaminelor D" cît și parathormonul (PTH) participă în reglarea metabolismului fosfo-calcic, nivelele și mecanismele lor de acțiune sînt diferite. PTH scade pragul renal de eliminare a fosfaților (crește fosfaturia); pentru compensare, în scopul menținerii nivelului fosfatemiei, are loc o mobilizare a Ca^{2+} din oase și apare o hipercalcemie cu hipofosfatemie, deoarece eliminarea urinară a fosfaților depășește pe aceea a calciului.

O legătură între „sistemul vitaminelor D" și PTH apare, însă, pe planul *reglării* producției $1,25-(OH)_2-D_3$, și, în consecință a asigurării echilibrului fosfo-calcic. Astfel, o dietă săracă în calciu stimulează puternic procesele de absorbție a Ca^{2+} intestinal față de nivelul de la animalele cu aport normal sau excesiv de calciu; *hipocalcemia* — produsă prin carența vitaminei D, cînd absorbția Ca^{2+} și a fosfaților este deficitară și nivelul lor sanguin scăzut și în alte situații similare — este imediat înregistrată de paratiroide și ele răspund prin secreția de PTH, care, stimulează producția crescută a $1,25-(OH)_2-D_3$ și aceasta, la rîndul ei, activează absorbția Ca^{2+} din intestin. Capacitatea intestinului de a se adapta la necesitățile de calciu ale organismului pare a fi în întregime mediată prin modularea sistemului de enzime de hidroxilare implicate în activarea „secundară" a calciferolului, respectiv în nivelul de producere a $1,25-(OH)_2-D_3$ și/sau a altor derivați hidroxilați activi. Activarea sistemului transportor de Ca^{2+} intestinal devine manifest după 3 h de la administrarea PTH (cu maximul la 6 h și dispariția efectului după 24—48 h). În reglarea metabolismului fosfo-calcic, la diferite nivele, intervin mecanismele de reglare *feed-back*, atît în activarea (hidroxilările „secundare") ale vitaminelor D, cît și în producția și secreția în circulație a parathormonului.

Corelații cu alte metabolisme. Legătura „sistemului vitaminelor D" cu metabolismul *lipidelor* se relevă în special în cursul absorbției; absorbția vitaminelor și provitaminelor D necesită un nivel optim de lipide alimentare și de aceea cantitățile prea mici și respectiv prea mari de lipide sau prezența uleiului de parafină (nonabsorbabil) scad semnificativ aportul de vitamină D și pot cauza fenomene de carență (rahitism).

În privința corelației cu *glucidele* se menționează că lactoza crește absorbția și retenția Ca^{2+}, Mg^{2+} și fosfaților și favorizează osificarea, și, pe de altă parte, faptul că în rahitism fosforilarea glucozei și a altor oze este deficitară; pe acest fond, razele U.V. au efecte similare insulinei.

2.1.3.3.2. IMPORTANȚA VITAMINELOR D PENTRU ȚESUTURI ȘI ORGANE

În carența vitaminei D, *mușchii scheletici* își pierd tonicitatea (artropatie) și este afectată *musculatura netedă*, cu scăderea tranzitului alimentar, concomitent cu alterarea florei intestinale și a proceselor biochimice de la acest nivel,

traduse prin eliminarea fecalelor alcaline; ligamentele devin laxe (abdomen mărit) *(T. F. Zucker şi colab., 1923, 1938)*.

Alterările *sistemului nervos* ce acompaniază rahitismul ar putea fi datorate scăderii calcemiei, în special la copii, cu iritabilitate, tresăriri, strigăte, tetanie, spasmele glotei, cu oprirea respiraţiei; copilul se sufocă şi prezintă o culoare violacee.

Corelaţia cu *glandele endocrine* se relevă prin modificările hipofizei şi tiroidei (scăderea metabolismului bazal în rahitism) şi, aşa cum s-a menţionat, cu paratiroidele, în reglarea nivelului calciului şi fosfaţilor.

Afectarea *hematopoezei* în rahitism rezultă din scăderea absorbţiei fierului (anemie feriprivă).

Acţiunea *antiinfecţioasă* a vitaminelor D este ilustrată prin frecvenţa mai mare a infecţiilor la copiii rahitici şi confirmată experimental prin scăderea rezistenţei şobolanilor carenţaţi faţă de virusul gripal *(C. A. Young şi colab., 1949)*; prin sensibilitatea crescută a maimuţelor rahitice la virusul poliomielitei; reacţia opsonofagocitară faţă de stafilococul auriu a puilor de găină complet carenţaţi este mai scăzută, faţă de puii cu aport insuficient de vitamină D sau hrăniţi normal; primul grup nu poate fi protejat prin vaccinare, spre deosebire de ultimele două grupe; stimularea anticorpogenezei faţă de toxoidul difteric este redusă la şobolanii rahitici *(A. E. Axelrod, J. Pruzanski, 1955)*.

2.1.3.4. *HIPO- ŞI AVITAMINOZA D. RAHITISMUL*

Instalarea rahitismului implică un lanţ cauzal de „evenimente": absorbţia intestinală scăzută a Ca^{2+}, ca urmare a deficitului „sistemului vitaminelor D", nu acoperă pierderile şi apare un bilanţ negativ al calciului; scăderea nivelului Ca^{2+} declanşează printr-un mecanism *feed-back negativ* secreţia parathormonului, care caută să „normalizeze" nivelul calcemiei, dar aceasta se face pe seama mobilizării Ca^{2+} din oase şi/sau scăderea mineralizării, respectiv prin „reducerea masei osoase". Acest deficit se reflectă atît asupra oaselor vechi, care se subţiază, prin pierderea progresivă a masei calcefiate formate înainte de instalarea rahitismului, cît şi asupra oaselor în creştere, în care lipsa sărurilor de calciu produce o acumulare excesivă a matricei necalcefiate (ţesut osteoid) cu alterarea (inversarea) raportului: ţesut mineralizat/ matrice organică (trabeculele de os nou format sînt alcătuite aproape numai din compuşi organici). Unii autori semnalează o scădere a carboxilazelor din cartilaje *(E. Bareri, 1955; I. Tessari, 1950)*. Apar astfel modificări evidente ale oaselor lungi în creştere, la joncţiunea dintre cartilaj şi diafiză; capilarele din regiunea diafizară proliferează, invadează cartilajul şi înlocuiesc celulele degenerate, iar osteoblastele depozitează ţesut osteoid în loc de ţesut osos. Între primele semne de vindecare ale rahitismului se constată apariţia unei linii drepte în zona de cartilaj paralelă cu marginea diafizei („linia *Mueller*" sau „zona de calcefiere") care relevă formarea cartilajului nou, calcificat.

Avitaminoza D poate apare spontan la unele animale: cîini tineri, porci, oi, păsări de curte; la acestea şi rahitismul experimental se obţine mai uşor decît la iepuri, şoareci sau şobolani, la care producerea rahitismului necesită, pe lîngă carenţarea în vitamină D, păstrarea la întuneric şi modificarea raportului Ca/ fosfaţi, alimentar.

Scanned with OKEN Scanner

Rahitismul animalelor se caracterizează prin modificări ale compoziție sîngelui, cu alterarea concentrației și raportului Ca/fosfați și a echilibrului acido-bazic, pe seama acizilor organici (citric, tartric); modificări ale scheletului, pe fondul unei mineralizări deficitare și decalcefieri generalizate, cu lărgirea zonelor cartilajelor epifizare și deformări osoase.

2.1.3.4.1. NECESITĂȚI. CAUZELE HIPOVITAMINOZELOR. INTERACȚIUNI. ANTIVITAMINE

Vitamina D este esențială numai pentru vertebrate. Organismul uman este capabil să sintetizeze cantități de provitamină D_3 (7-dehidrocolesterol) care asigură minimul necesităților normale. În consecință, rahitismul uman este mai puțin cauzat de carența provitaminelor sau vitaminelor alimentare și mai mult de scăderea gradului de transformare a provitaminelor la vitamine în stratul bazal al pielii, în condițiile de viață care limitează efectul U.V. (lipsa soarelui) sau în unele stări fiziopatologice.

În anumite arii ale globului (în regiunile polare), lipsa soarelui este un factor potențial rahitogen, totuși, rahitismul nu apare, de obicei, datorită consumului de ficat de pești oceanici, singura sursă naturală bogată în vitamine D gata elaborată (7.000—50.000 U.I./g ficat), în parte ca vitamină D esterificată.

Cauzele majore ale rahitismului sînt determinate de condițiile în care omul nu beneficiază real de acțiunea razelor solare (U.V.), (poluarea atmosferei cu prafuri industriale „smog" și ceață; umbra produsă de blocurile înalte pe străzi înguste; geamurile de sticlă; îmbrăcămintea de iarnă; desfășurarea activităților în locuri de muncă lipsite de soare (în mine); imobilizarea bolnavilor, infirmilor și bătrînilor în locuințe întunecate etc.)

În condițiile necesităților crescute, de exemplu, în graviditate și alăptare, cînd mama trebuie să asigure și cerințele, destul de mari, ale fătului și sugarului (cu procese de mineralizare intense), se impune un aport de 400 U.I./zi prin dietă bogată în vitamină D (unt, ouă, ficat) și respectiv prin preparate de untură de pește sau de vitamine D; copiii imaturi și sugarii beneficiază de laptele matern, dar primii necesită o terapie cu vitamină D.

Un factor important în prevenirea rahitismului este asigurarea raportului optim Ca/fosfați de 1,1 și de aceea lipsa vitaminei D sau un regim în care raportul Ca/fosfați este alterat sau care este sărac în calciu poate provoca rahitismul, în special la copii *(G. Staerns; P. G. Jeans, 1935; C. P. Dancaster, W. P. Jackton, 1961; M. C. Dinnigan, J. P. F. Patton și colab., 1963)*.

Rahitismul poate apare și în condițiile alterării absorbției vitaminei D și respectiv a lipidelor la nivelul mucoasei intestinale, ca de exemplu, în steatoree, boala celiacă, afecțiuni pancreatice și hepatice.

Avînd în vedere necesitatea imperioasă ca vitaminele D să fie activate „secundar" pentru a-și exercita pe deplin efectele biochimice este posibilă apariția unui tip special de rahitism cauzat de afectarea sistemului hidroxilazelor hepatice și/sau renale și care este refractar la terapia cu vitamină D („vitamin-D-rezistent"), dar, poate ceda la administrarea vitaminelor D activate secundar, sintetice (a se vedea cap. *2.1.3.2. și 2.1.3.3)*.

Copiii născuți prematur se caracterizează printr-o *imaturitate* a enzimelor de hidroxilare hepatice implicate în activarea „secundară" a vitaminelor D și respectiv în metabolizarea medicamentelor (sistemul „OFMM", *D. Bedeleanu,*

Scanned with OKEN Scanner

M. Kory, 1976). Medicamentele puternic inductoare ale „OFMM", ca de exemplu, cele din terapia antiepileptică (hidantoină, luminal), în special la copii, și, respectiv consumarea cu regularitate a barbituricelor de către persoanele în vîrstă, la care se asociază și o expunere insuficientă la soare, alterează metabolismul vitaminelor D și pot provoca forme de rahitism rebele la terapia cu vitamine D, dar care cedează la administrarea $25-OH-D_3$ sau $1,25-(OH)_2-D_3$; în cazurile în care se înregistrează prăbușirea funcțiilor renale situația este mai gravă și necesită dializa extracorporală („rinichi artificial").

O altă formă, „rahitismul vitamin-D-rezistent hipofosfatic primitiv" este o boală genetică, familială, transmisă prin gene dominante sex-dependente. Deficitul genetic se manifestă în procesele de reabsorbție ale tubilor renali, cu creșterea fosfaturiei și aminoaciduriei, și în eficiența scăzută a vitaminei D în absorbția Ca^{2+} și fosfaților intestinali, în condițiile în care absorbția provitaminelor și vitaminelor D este normală. Boala se manifestă de obicei numai după vîrsta de doi ani sau chiar în pubertate, cu ritmul de creștere scăzut, curbarea membrelor și instabilitatea articulațiilor (ligamente laxe).

În privința interacțiunilor cu alte vitamine se constată o sinergie, la concentrații fiziologice optime, între vitaminele D și A; la doze mari, vitamina A antagonizează vitamina D, producînd demineralizări și friabilitatea oaselor, iar în cazul hipervitaminozei D are efecte de normalizare *(H. Thiers, 1956; J. Clark, A. L. Bassett, 1962)*.

Antivitaminele D. Cuprinzînd sub această denumire „capacitatea de producere a rahitismului la aport normal de vitamine D" se cunosc *factori rahitogeni*, ca de exemplu, *acidul fitic* (inozitolhexafosfat), care intră în competiție cu absorbția și depozitarea calciului *(E. Mellanby și colab., 1921)*, sau vegetalele bogate în caroteni, de ex. spanacul *(Lecoq)*. Mai apropiați de noțiunea de „antivitamine" sînt însă compușii cu structură steroidă din unele plante (ovăz de iarnă, graminee de livadă) *(Y. Weitz, 1950, A. Grant, 1951)* și cortizona, care prezintă unele asemănări cu structura provitaminelor D *(Kodicek și colab., 1957)*.

2.1.3.4.2. MANIFESTĂRILE HIPO- ȘI AVITAMINOZEI (RAHITISMULUI) UMANE

La om, independent de vîrstă, primele semne ale carenței sînt de ordin *biochimic:* creșterea activității fosfatazelor alcaline la valori de 2—5 ori mai mari decît normal *(M. O. Kay)*; în continuare se înregistrează o scădere a concentrației P anorganic sanguin la jumătate din valorile normale (de exemplu, la copii, de la 4,6 la 2,3 mg%); calciul poate fi ușor scăzut sau nemodificat. Raportul Ca/P este de aproximativ 3 în carență, față de 1—2 la normali; valoarea produsului Ca x fosfați sub 3.000—4.000 indică un rahitism, în timp ce valorile peste 4.000 par a-l exclude.

Rahitismul copilului. Apariția rahitismului la noul născut presupune deficitul aportului de calciu prin schimburile materno-fetale placentare încă din viața intrauterină (perioada prenatală); se consideră că fătul necesită în ultimul trimestru 5% din Ca^{2+} plasmatic difuzibil și 10% din P_i circulant al mamei. Carența poate continua și în perioada neonatală și respectiv pe durata alăptării sugarului, fie prin aportul insuficient de vitamină D și Ca^{2+} din laptele matern și, în special, prin hrănirea cu biberonul.

Scanned with OKEN Scanner

În asemenea carenţe, de la naştere şi care evoluează în continuare, se observă modificări progresive, în raport cu avansarea în viaţă. Semnele precoce sînt o stare de nelinişte, iritabilitate, semne motorii, transpiraţii, spasmofilie (care se înregistrează în condiţiile în care nivelul Ca^{2+} seric scade la 6—7 mg%) şi adesea anemie feriprivă; din prima „jumătate de an" de viaţă apare trilogia leziunilor osoase: „ramolire, umflare, deformare". Palparea craniului în părţile posterioare ale oaselor parietale şi temporale (sutura lamboidă) şi în cele laterale ale occipitalului permite decelarea zonelor de ramolisment; sutura fontanelelor este mai tardivă (fontanelele anterioare se obturează, normal, pînă la 18 luni şi mult mai tîrziu şi incomplet la copiii rahitici) şi evoluează spre deformări ale craniului: *caput quadratum*, frunte „olimpiană" (luna a 9-a) şi craniu ovalar (plagiocefalic), alterare secundară produsă de apăsarea creierului asupra cutiei craniene, cînd copilul doarme pe aceeaşi parte.

În continuare, apar tulburări ale dentiţiei (hipoplazie dentară) cu deformarea bolţii palatinului, protruzia (anterioară) a osului incisiv; prima dentiţie apare cu întîrziere (după 10 luni) şi nu se termină nici la 3 ani; anomaliile se extind şi asupra celei de a doua dentiţii: dinţi alteraţi, carii şi alte tulburări, pe fondul unor anomalii ale articulaţiilor dentare şi a deformării maxilarelor.

La vîrsta de 1—2 ani se înregistrează modificări la nivelul cutiei toracice, ca de exemplu, „mătăniile costale" (sub forma unor „bile" la articulaţiile condro-costale, palpabile la nivelul inserţiei coastelor pe stern), aplatizarea laterală a coastelor şi proiectarea înainte a sternului ducînd la torace în „carenă" („piept de găină") ce împiedică dezvoltarea şi funcţionarea normală a plămînilor; cifoscolioză şi „spate rotund". În acelaşi timp, se observă şi un bazin strîmtat, anomalie ce persistă toată viaţa şi poate aduce dificultăţi în timpul naşterii la femeile cu antecedente de rahitism, chiar aparent vindecate.

Alterările membrelor încep din primul an de viaţă, dar se manifestă mai pregnant către vîrsta de 2—3 ani prin „curbarea picioarelor" (picioare „de cavalerist" sau în „X"), braţe deformate, degete în formă de „cîrnat" etc.

Concomitent cu modificările scheletului, apare hipotonia muşchilor şi ligamentelor tradusă printr-un mers întîrziat şi defectuos; hipotonia muşchilor abdominali şi distensia gastro-colică duce la un abdomen mare, meteoric („pîntece de batracian") cu alterări digestive: aerogastrie, aerocolie, constipaţii cu episoade diareice, la care se adaugă frecvent o stare de anemie şi hipertrofie limfoidă *(H. Gounelle, C. Marnay, 1965)*.

Copilul rahitic se poate recunoaşte relativ uşor prin creşterea statuară şi ponderală subnormală; capul mare cu aspect caracteristic; abdomen proeminent; picioare curbate; modificările cutiei toracice şi „mătăniile costale", scolioză, cifoză; tulburări de dentiţie (hipoplazie dentară), pe fondul tulburărilor generalizate ale osificării.

Rahitismul adultului. Această stare apare rar, de exemplu la persoanele care îşi desfăşoară activitatea şi trăiesc în locuri lipsite de soare. O condiţie favorizantă este graviditatea şi lactaţia, cu tulburări ale indicatorilor biochimici umorali (creşterea fosfatazei alcaline; scăderea P anorganic seric); osteoporoză, curbarea coloanei vertebrale (în special la efort), modificări ale oaselor bazinului, coapselor, gambelor.

Manifestări rahitice pot apare şi la bătrîni, cu osteopatie tip osteoporoză (rarefierea osului) şi osteomalacie (ramolirea osului); menţionăm că delimitarea prin aceşti termeni este mai mult de interes teoretic decît practic. Consecinţele carenţei vitaminei D sînt, în acest caz, predispoziţia crescută la fracturi, cu

Scanned with OKEN Scanner

vindecarea lor dificilă, şi manifestări de tetanie. Rahitismul adultului implică, de obicei, pe lîngă avitaminoza D şi un deficit mai general în calciu, fosfaţi, proteine, lipide etc. În asociere cu carenţa în vitamina C apare *rahitismul celiac*, cu un deficit simultan şi al vitaminelor A, E şi ale calciului, manifestat printr-un tablou clinic complex.

2.1.3.5. *HIPERVITAMINOZA D. TOXICITATEA VITAMINELOR D*

Consumul exagerat al vitaminelor D, în cantităţi de peste 2.000 U.I./zi (de 5 ori mai mari decît necesităţile reale), pe perioade lungi de timp, pot cauza hipercalcemii cu blocarea secreţiei hormonilor paratiroidieni şi nefrocalcinoză, cu scleroză glomerulară, adesea fatale. Asemenea situaţii nu apar din cauze alimentare ci prin consum abuziv de preparate de vitamină D, respectiv de untură de peşte.

Vitaminele D în doze foarte mari pot produce fenomene toxice: anorexie, vărsături, diaree şi alte tulburări gastrointestinale; astenie; mialgii şi slăbire musculară; parestezii, pierderi în greutate, poliurie. Iniţial, aceste efecte s-au atribuit „impurităţilor" din preparatele farmaceutice (de exemplu, toxisteroli, formaţi în cursul iradierii provitaminelor D), dar ele persistă şi în cazul preparatelor de vitamină D perfect purificate. Un efect direct al excesului de vitamină D este decalcefierea oaselor şi hipercalcemia (17 mg Ca/100 ml faţă de valoarea normală de 10 mg/100 ml), cu consecinţe în calcefierile metastatice ale vaselor sanguine, cornee (degenerscenţă calcică), plămînului, inimii, rinichilor cu nefrocalcinoză şi uremie ce pot provoca moartea. Chiar la doze netoxice, administrate zilnic, se semnalează modificări în tiroidă, testicule, ovare *(Salniacov)*. La doze de 20.000 U.I./kg greut. corp., repetate mai multe zile, apar la puii de găină fenomene toxice, care nu se înregistrează la o doză unică de 1.000.000 U.I. În clinica umană, terapia de şoc, cu doze foarte mari de vitamină D este, în general, bine tolerată şi asigură necesităţile pe perioade de luni de zile, totuşi, dozele de 150.000 U.I./zi sau 600.000 U.I./săptămînă, repetate în tratamentul lupusului vulgaris produc, la 20% din pacienţi, fenomene toxice *(C. V. Moore, 1967)*; se pare că vitamina D_2 este mai toxică, la om, decît vitamina D_3.

În concepţia că vitamina D este un factor fortificator al copiilor, administrarea sa abuzivă, fără control medical, poate produce semnele bine cunoscute ale hipervitaminozei D şi a hipercalcemiei consecutive: iniţial, inapetenţă, greţuri, sete exagerată, apoi poliurie cu deshidratări, vărsături, constipaţii rebele pînă la o pareză intestinală, creşterea uremiei prin insuficienţă renală şi, final, astenie intensă, somnolenţă, şi chiar anurie *(O. Oprian, Gh. Stoicescu, 1979)*.

Avînd în vedere acţiunile multiple ale vitaminei D şi riscul producerii hipervitaminozei este necesar să se acorde o atenţie specială fenomenelor secundare ce pot apare la administrarea prelungită şi în doze mari (hipercalcemie), ce impune suprimarea tratamentului şi instituirea unui regim hidric, sărac în calciu şi fosfaţi şi faptului că nefritele, litiaza, procesele degenerative şi afecţiunile cardiovasculare (de exemplu, ateroscleroza) constituie contraindicaţii ale terapiei cu vitamină D.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.3.6. *PROFILAXIA ŞI TERAPIA RAHITISMULUI*

Pentru profilaxia rahitismului este necesar ca, în special copiii, să beneficieze de viaţa în aer liber (soare, băi de apă). Rolul razelor U.V. din spectrul solar *(fig. 2.23)* este de a asigura transformarea provitaminelor în vitamine D, atît prin efectul direct asupra omului şi animalelor, cît şi în industrie (preparate farmaceutice, alimente iradiate).

Pe lîngă condiţiile de mediu şi igienă, femeile în perioada de graviditate şi alăptare trebuie să beneficieze de o alimentaţie care să asigure aportul optim de vitamină D şi alte vitamine, calciu, fosfaţi, proteine, (unt, lapte, ouă, carne, legume, fructe). Aceleaşi recomandări sînt valabile şi pentru copii, care, în plus, pot beneficia de untura de peşte şi/sau de preparatele cu vitamină D şi A; în cazul prematurilor şi al copiilor mici cu boli infecţioase cronice (în special toamna şi iarna), terapia cu vitamină D este o indicaţie majoră.

Laptele matern este o sursă optimă de vitamină D pentru sugari; laptele provenit de la vite poate manifesta eficienţă în profilaxia sugarilor, cu precizarea că alimentaţia şi condiţiile de viaţă ale animalului (păstrarea în grajduri întunecate) influenţează negativ conţinutul de vitamină D, de aceea în regiunile expuse rahitismului se utilizează laptele iradiat (135 U.I./lt), care are, însă, un miros şi gust neplăcut, şi, în consecinţă, se preferă hrănirea vitelor cu furaje, cu adaus de drojdie (bogată în provitamine D), iradiate sau chiar expunerea animalelor la lămpi furnizoare de radiaţii U.V.

Un preparat larg utilizat este *untura de peşte* (uleiul din ficatul unor peşti oceanici sau marini; *cap. 2.1.2.2*) care conţine 85 U.I. vitamină D şi 850 U.I. vitamină A/g; două linguriţe asigură 650 U.I. vit. D şi 6.500 U.I. vit A (în cantităţi şi raport optim).

În afară de profilaxia şi terapia rahitismului, preparatele de vitamină D se recomandă în decalcefierile din graviditate, osteomalacie, osteoporoză, consolidarea fracturilor, în unele forme de TBC; în dentiţia întîrziată şi în prevenirea

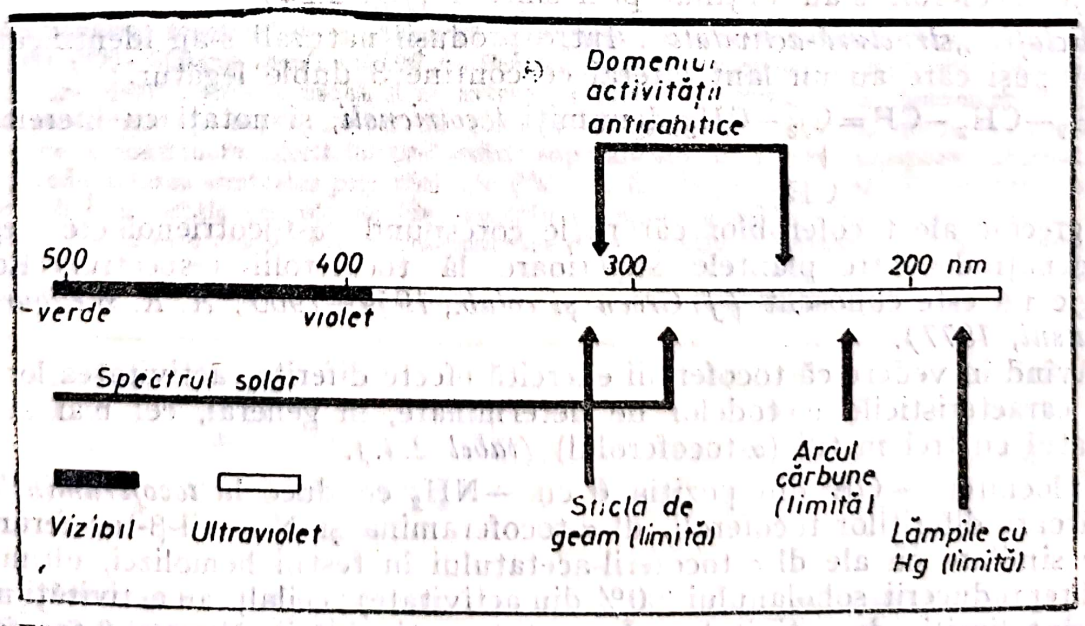


Fig. 2.23. Activitatea antirahitică a spectrului solar (după S. M. Rapoport, 1969)

cariilor; în leziuni cutanate ulcerative; astm; saturnism (pentru fixarea şi eliminarea Pb) etc.

În condiţiile afectării hidroxilazelor implicate în activarea secundară a vitaminelor D este recomandabilă administrarea 1,25—$(OH)_2$—D_3 sintetică, de exemplu în afecţiunile osoase care însoţesc cirozele biliare, nefritele cronice cu parenchim renal alterat, în terapia îndelungată cu barbiturice, hidantoină, precum şi în insuficienţele paratiroidelor, care necesită doze repetate de vitamină D pentru normalizarea calcemiei ce predispun la intoxicaţii; acestea pot fi evitate prin administrarea derivaţilor hidroxilaţi, care se elimină mai rapid şi nu se acumulează *(Martin, D. W. şi colab., 1983)*.

2.1.4. TOCOFEROLII. VITAMINA E. VITAMINA ANTISTERILICĂ

Descoperirea vitaminei E este legată de observaţia că şobolanca hrănită numai cu lapte se dezvoltă bine, dar prezintă tulburări de reproducere *(H. A. Mattill, R. E. Conclin, 1920)*; că adăugarea frunzelor verzi sau a germenilor de cereale previne sterilitatea carenţială *(H. M. Evans, K. S. Bishop, 1922)* şi că factorul activ este liposolubil şi insaponificabil *(B. Sure, 1924)*. Iniţial a fost considerat ca necesar femelelor pentru a duce gestaţia la termen şi la masculi pentru formarea spermatozoizilor, de unde denumirea de vitamină *„antisterilică"* sau *„a fecundităţii" (H. M. Evans, 1927)*, respectiv *„tocoferol"* (tocos = sarcină, phero = a purta, a duce); ulterior s-au relevat şi alte efecte, dintre care un interes special prezintă acţiunea *antioxigen*. În prezent, se cunoaşte structura *(H. M. Evans, O. E. Emerson şi colab., 1936—1937)*, confirmată prin sinteză (P. Karrer, 1938).

2.1.4.1. *STRUCTURA ŞI PREPARAREA TOCOFEROLILOR*

Vitamina E naturală este un amestec de compuşi care au la bază TOCOLUL = 2-metil-2-(4', 8', 12' -trimetil-tridecil)-croman-6-ol. De la acesta, prin înlocuirea totală sau parţială a H din poziţiile 5,7 sau 8 cu metili, se obţin *tocoferolii naturali:* α-tocoferol (5, 7, 8-trimetil-tocol); β (5, 8-dimetil-tocol); γ (7,8-dimetil-tocol) şi δ (8-metil-tocol), toţi având cel puţin un $—CH_3$ în poziţia 8. Ceilalţi tocoferoli s-au obţinut prin sinteză *(fig. 2.24)*

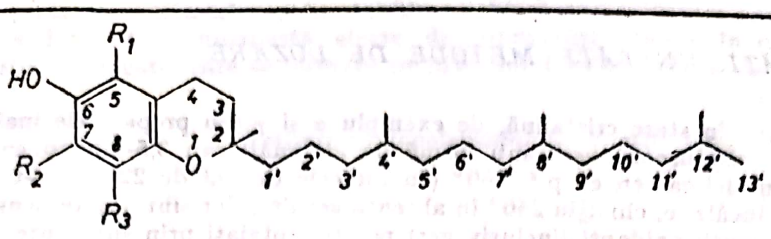
Relaţii „structură-activitate". Între produşii naturali s-au identificat o serie de compuşi care au un lanţ lateral ce conţine 3 duble legături:

$—(CH_2—CH_2—CH=\underset{\displaystyle CH_3}{\underset{|}{C}})_3—CH_3$ denumiţi *tocotrienoli*, şi notaţi cu literele alfabetului grecesc ale tocoferolilor cărora le corespund: α-tocotrienol etc.; ei pot fi hidrogenaţi de către plantele superioare la tocoferolii respectivi. Rolul lor biologic nu este cunoscut *(J. Green şi colab., 1959—1960; A. R. Wellburn, 1970, G. Katsui, 1977)*.

Având în vedere că tocoferolii exercită efecte diferite, activitatea lor variază după caracteristicile metodelor de determinare, în general, cel mai activ este derivatul cu trei metili (α-tocoferolul) *(tabel 2.4.)*.

Înlocuirea —OH din poziţia 6 cu $—NH_2$ conduce la *tocoferaminele* corespunzătoare diferiţilor tocoferoli. dl-α-tocoferamina şi N-metil-β-tocoferamina au efecte similare cu ale dl-α-tocoferil-acetatului în testul hemolizei, ultimul şi în testul reproducerii şobolanului (90% din activitate); ceilalţi au activităţi mai mici sau sînt lipsiţi de activitate. În testul antioxidării, N-metil-β-tocoferamina

Scanned with OKEN Scanner



$R_1 = R_2 = R_3 = H$: TOCOL = 2-metil-2(4',8',12'-trimetil-tridecil)-croman-6-ol

Tocoferol	R_1 (5)	R_2 (7)	R_3 (8)	Structura	Nr. metili
α	CH_3	CH_3	CH_3	5,7,8-trimetiltocol	trimetil
β	CH_3	—	CH_3	5,8-dimetiltocol	dimetil
γ	—	CH_3	CH_3	7,8-dimetiltocol	"
sinteză	CH_3	CH_3	—	5,7-dimetiltocol	"
δ	—	—	CH_3	8-metiltocol	monometil
sinteză	—	CH_3	—	7-metiltocol	"
sinteză	CH_3	—	—	5-metiltocol	"

Fig. 2.24. Structura tocoferolilor naturali şi de sinteză

manifestă activitate similară cu α-tocoferolul, iar β-tocoferamina, 1/2 din activitate; primul, precum şi N, N-dimetil-δ-tocoferamina se consideră utili ca antioxidanţi alimentari nontoxici *(U. Schwieter şi colab., 1966, 1967; J. G. Bieri şi colab., 1967, 1968; G. Katsui, 1977).*

Pentru *obţinerea* tocoferolilor se utilizează extragerea din sursele naturale, de exemplu, din germenii de grîu (200—300 mg tocoferoli/100 g). Pentru obţinerea acestora se lasă grîul să încolţească şi se separă „germenii", care se usucă şi se extrag cu solvenţi organici (eter, benzen etc.); după îndepărtarea solventului se obţine „oleul de germeni de grîu" (8—10% din greutatea germenilor), care se supune în continuare diferitelor prelucrări: saponificare; dizolvarea insaponificabilului în eter de petrol şi îndepărtarea sterinelor prin răcire la 0°C *(O. H. Emerson, H. M. Evans)*; în procedeele actuale se aplică adsorbţia pe coloane (de exemplu cu oxid de Al) şi eluare (de exemplu, cu eter de petrol). Altă cale este cea sintetică prin procedee diferite, din durohidrochinonă şi bromură de fitil *(fig. 2.25).*

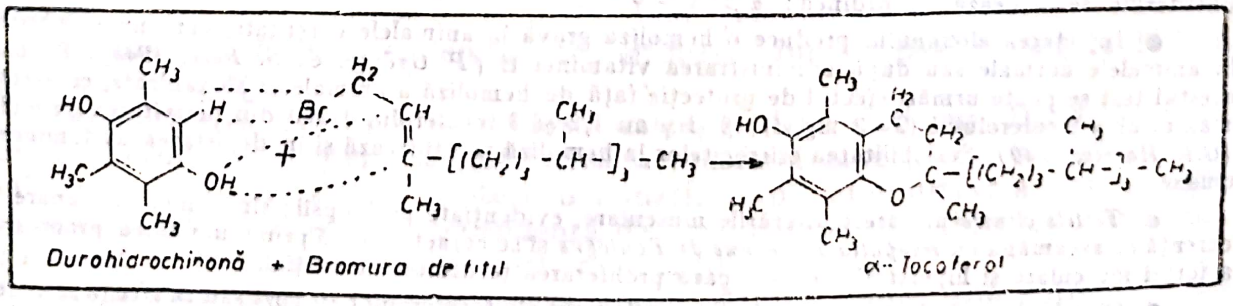


Fig. 2.25. Sinteza α-tocoferolului

Scanned with OKEN Scanner

2.1.4.2. PROPRIETĂȚI. UNITĂȚI. METODE DE DOZARE

Tocoferolii se obțin greu în stare cristalină, de exemplu α și γ din preparatele înalt purificate *(C.D. Robeson, 1943)*, dar cristalizează ușor sub formă de alofanați sau 3,5-dinitrobenzoați; dl-α-tocoferolul se prezintă ca un ulei galben cu p.f. 160° (cu indicele de iod de 220) și β-tocoferolul cu p.f. 135°C. Sînt rezistenți la încălzire, chiar la 250° în absența aerului, dar sînt foarte sensibili la oxigen și razele U.V.; față de agenții oxidanți (inclusiv aer) pot fi protejați prin substanțe reducătoare, cu rol de stabilizanți (hidrochinonă, acid ascorbic); hidrogenarea conduce la compuși care păstrează, parțial, activitatea biologică. Tocoferolii sînt relativ stabili față de soluțiile alcaline sub 40°C.

1. U.I. = 1 mg dl-α-tocoferol acetat; dl-α-tocoferolul liber sintetic are o activitate de 1,1 U.I./mg; D-α-tocoferolul natural 1,49 și acetatul său 1,39 U.I./mg. Definirea U.I. este destul de neprecisă, deoarece dl-α-tocoferol acetatul (all rac-α-tocoferol acetat) este un compus ce se sintetizează în 8 tipuri de diasteroizomeri *(G. Katsui, 1977)*.

În *domeniul farmaceutic*, se utilizează *acetatul de α-tocoferol (Tocopheroli acetas, F.R. IX)* cu proprietăți fizico-chimice asemănătoare cu ale tocoferolului liber. Este sensibil la lumină și ușor oxidabil în contact cu aerul și incompatibil cu substanțele oxidante (inactivări prin oxidare) și alcaline (hidroliză); poate fi sterilizat la 150°C/60 minute, protejat cu hidrochinonă.

Se utilizează și ca antioxidant (prin adăugare în proporție de 0,01—0,03% la uleiuri, imediat după preparare), dar, în unele cazuri, la fel cu acidul ascorbic, poate exercita o acțiune de prooxidare care accelerează rîncezirea produsului, de aceea se preferă în acest scop butilhidroxianisolul sau galatul de propil *(din V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Metode de dozare. ● Determinarea absorbției în U.V. (pentru preparatele pure);

● Încălzirea α-tocoferolului (soluție alcoolică) cu HNO_3 conduce la o chinonă de culoare roșie (absorbția maximă la 450 nm);

● Reacția de oxidare cu $FeCl_3$ *(Furter, Mayer, 1939)* și determinarea Fe^{+2} format cu α, α'-dipiridil (culoare roșie);

● Deoarece reacția interferează cu diferite substanțe reducătoare (inclusiv carotenii), se recomandă utilizarea hexacianoferatului (III) de potasiu în soluție alcool-cloroformică; reacția cu tocoferolii are loc în 15 secunde, timp în care carotenii nu reacționează *(A. Vinet, P. Meunier, 1940—1941)*.

● În prezență de acid fosfomolibdenic apare o colorație galben-verde; reacția nu este afectată de steroli, dar interferează cu carotenii.

În toate aceste reacții, intensitatea culorii depinde de natura tocoferolilor: derivații trimetilați (α-tocoferolul) prezintă intensitatea maximă; lipsa unui $-CH_3$ de lîngă $-OH$ (β și γ-tocoferoli) reduc intensitatea culorii la 1/2, iar derivatul cu un singur $-CH_3$ (δ-tocoferol) are numai 1/4 din culoarea α-tocoferolului.

● Metodele cromatografice, pe hîrtie siliconată sau impregnată cu ulei de parafină *(F. Brown, K. L. Baxter, 1951)*, permit separarea tocoferolilor în grupele cu 3, 2 și respectiv 1 metil, dar nu-i separă pe cei din aceeași grupă. Cromatografia pe hîrtie impregnată cu $ZnCO_3$ și eluată cu ciclohexan și identificarea spoturilor cu $FeCl_3$ + α, α'-dipiridil, dă rezultate mai bune, totuși, nu separă toți tocoferolii. Cromatografia, inițială pe hîrtie impregnată cu $ZnCO_3$ și apoi, pe aceeași hîrtie, după impregnare cu ulei de parafină, permite separarea celor 7 tocoferoli cunoscuți.

Metodele biologice au avantajul de a oferi indicații asupra efectelor biochimico-fiziologice ale vitaminelor E.

● Testul antisterilității utilizează pui de șobolan (femele) supuși, de la naștere, unui regim carențat în vitamină E. Cînd ating greutatea de 150 g se împerechează cu masculi sănătoși. În timp ce femelele normale nasc la 20—21 zile pui sănătoși, cele carențate încep să piardă în greutate din ziua a 16-a, cînd se produce întreruperea sarcinii și resorbția fătului (abort). Intensitatea efectului antisterilic se situează în ordinea: $\alpha > \beta > \gamma > \delta$.

● Injectarea aloxanului produce o hemoliză gravă la animalele carențate, care nu se observă la animalele normale sau după administrarea vitaminei E *(P. György, C. S. Rose, 1948)*. Pe baza acestui test se poate urmări efectul de protecție față de hemoliză a animalelor aloxanizate, cu efectul maxim al α-tocoferolului (2—3 mg/zi); β și γ au 1/2 și δ-tocoferolul 1/100 din activitatea primului *(O.L. Harris, 1949)*. Sensibilitatea eritrocitelor la hemoliză se utilizează și în depistarea avitaminozei umane.

● *Testele clinice* urmăresc alterările musculare, evidențiate pe biopsii; sindromul care apare în carență se aseamănă cu *miopatia Duchenne de Boulogne* și se caracterizează prin diminuarea progresivă a forței musculare și hipertrofie ce ilustrează proliferarea țesutului interstițial.

● O serie de metode urmăresc efectele *antioxigen* ale tocoferolilor *in vitro* sau *in vivo* (a se vedea în continuare).

Scanned with OKEN Scanner

În interpretarea rezultatelor și în stabilirea echivalenței biologice a tocoferolilor este necesar să se aibă în vedere că ei manifestă efecte de intensități diferite, în raport cu structura lor și cu specificul testelor aplicate, care se bazează pe principii diferite *(tabelul 2.4.)*.

TABELUL 2.4

Activitatea tocoferolilor în diferite teste

ACTIVITATE (TEST)	TOCOFEROLI
ANTISTERILICA : ——→	$\alpha > \beta > \gamma > \delta$ 100 40 30
ALOXAN (hemoliza) : ——→	$\alpha > \beta = \gamma > \delta$ 100 50 50 1
R. CHIMICE (fosfomolibdat) : →	$\alpha > \beta = \gamma > \delta$ 100 60 60 25
ANTIOXIGEN (in vitro) : ——→	$\alpha < \beta < \gamma < \delta$ 100 130 180 270

2.1.4.3. *OXIDOREDUCERILE ȘI METABOLISMUL TOCOFEROLILOR*

In vitro. Produșii de oxidare ai tocoferolilor diferă în raport de structura lor și natura oxidanților și de condițiile de lucru *(figura 2.26)*.

Prin oxidarea blîndă a α-tocoferolului cu $FeCl_3$, $AgNO_3$ sau prin „titrare potențiometrică" cu $AuCl_3$ se obține *tocoferilchinona*, care se reduce cu Pd/alcool sau Zn/acid acetic la *tocoferilhidrochinonă* (instabilă). Acești compuși sînt inactivi pe testul antisterilității, dar manifestă activitate (i.v.) asupra distrofiei musculare.

Oxidarea α-tocoferolului cu 2 echivalenți $FeCl_3$ în prezență de α, α'-dipiridil formează un *epoxid*, care redus, imediat, cu acid ascorbic reface α-tocoferolul; după cîteva ore reacția devine ireversibilă și epoxidul trece în *α-tocoferilchinonă*.

În condiții mai energice de oxidare a α-tocoferolului cu HNO_3 sau prin oxidarea α-tocoferolului în aer se obține *γ-tocoferilchinona* (roșie). Prin oxidare în prezența acidului fosforic, sulfuric, tartric etc. se formează *croman-5,6-chinona* și alți produși, între care se pot identifica semichinone și radicali liberi; oxidarea cu $K_3[Fe(CN)_6]$ duce, între altele, la formarea unor dimeri și trimeri *(fig. 2.26)*.

Metabolism. Biosinteza tocoferolilor are loc în plante, prin intermediul acidului mevalonic, după principiul poliizoprenilor *(fig. 2.6A)*. Din alimente, vitamina E (10—20 mg/zi) se absoarbe la nivelul intestinului subțire, în condițiile integrității mecanismelor implicate în resorbția lipidelor și vitaminelor liposolubile.

Vitaminemia E (tocoferolemia) se situează între 0,6—1,5 mg la 100 ml (în medie 1 mg %).

Administrarea *per os* a unor doze unice de 100—500 mg DL-δ-tocoferilacetat determină o creștere semnificativă a tocoferolemiei (după 6 ore); dozele orale repetate zilnic produc creșteri mai mari. După administrarea parenterală, creșterea tocoferolemiei este dependentă de tipul compusului (tocoferol liber sau sub formă de fosfat monosodic) și de vehicul (ulei sau apă).

Organismul uman conține cîteva grame de tocoferoli; concentrațiile cele mai mari se găsesc în lipidele din testicul și uter (1.100—1.200 mg%) și în țesu-

Scanned with OKEN Scanner

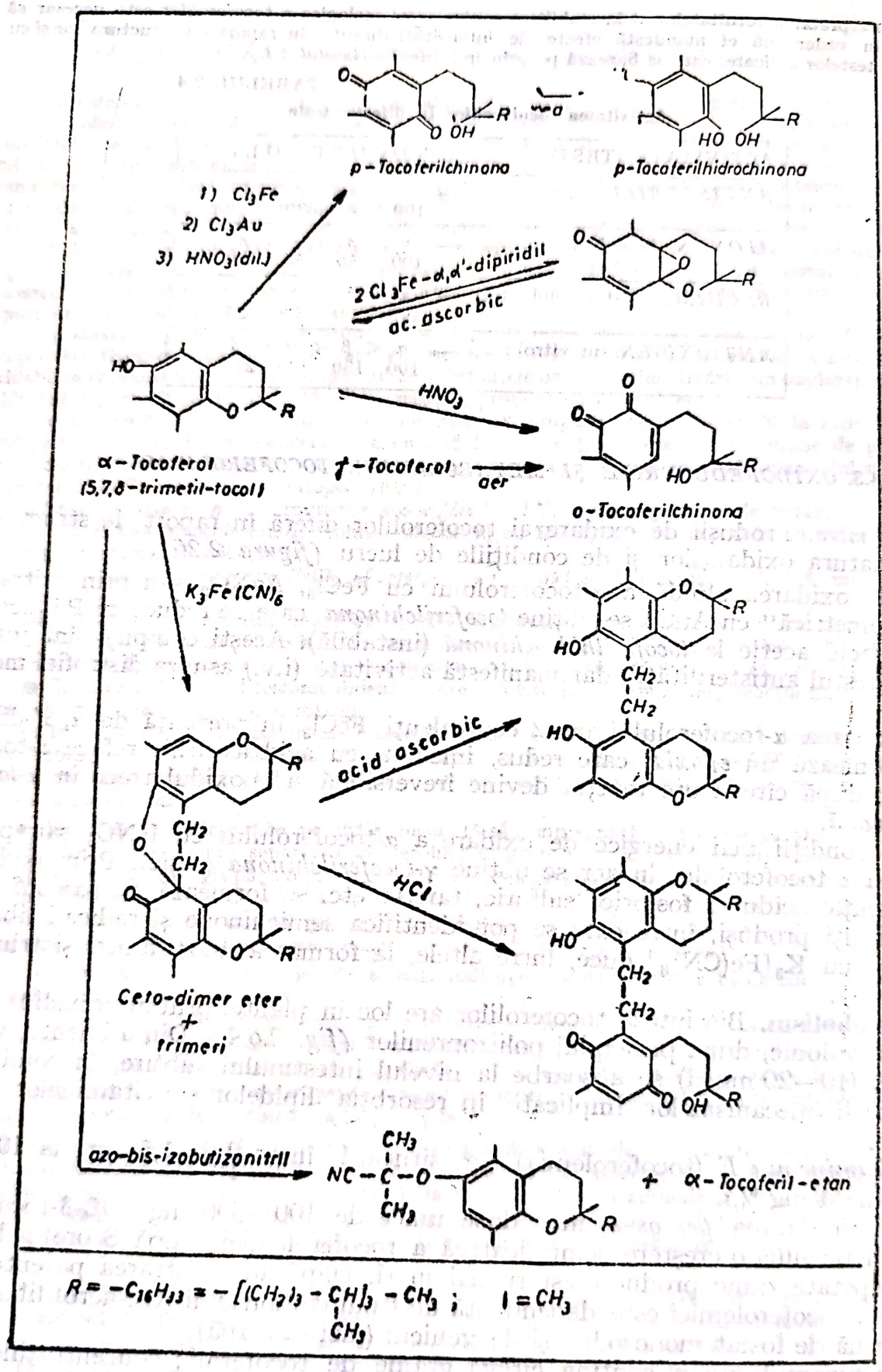


Fig. 2.26. Oxidarea tocoferolilor „in vitro"

tul a dipos (300—600 mg%), care, prin mărimea sa, reprezintă principalul depozit; se găsește, în concentrații mai mici în hipofiză, suprarenale, inimă, splină, ficat.

Oxidările in vivo. În cursul proceselor metabolice, tocoferolii se transformă în *tocoferilchinone* și *tocoferilhidrochinone* (prin reacții, în parte, reversibile) și în compuși *dimeri* și *trimeri*. După inj. i.v. sau s.c. a ^{14}C-α-tocoferolului se regăsește 20—30% din activitate în urină și 70—80% în fecale. Metabolitul urinar major este un compus cu ciclu benzochinonic și lanțul scurtat și anume: 2-(3-hidroxi-3-metil-5-carboxipentil)-3,5,6-trimetil-1,4-benzochinona și/sau lactona și glucuronidul său *(fig. 2.27) (E. J. Simon și colab.,; 1955—1956; G. Katsui, 1977)*.

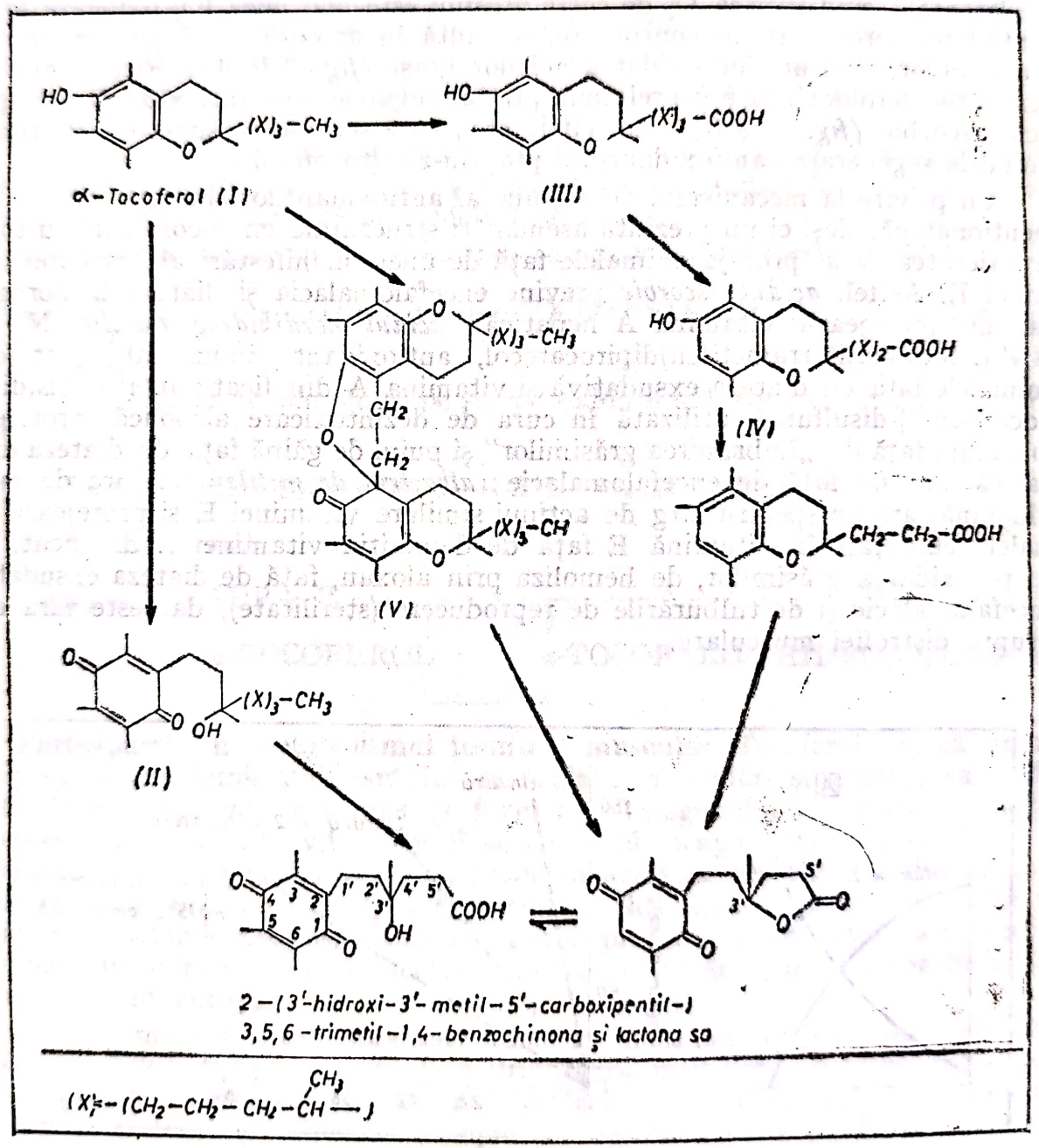


Fig. 2.27. Căile metabolice ale α-tocoferolului (oxidoreduceri „in vivo") (după F. Korte, M. Goto 1977). **Compușii II, III, IV și V injectați i.v. la șobolan s-au eliminat, la fel cu α-tocoferolul, prin urină sub formă de lactonă (ultimul compus din schemă).**

2.1.4.4. ROLUL ŞI EFECTELE BIOCHIMICE ALE TOCOFEROLILOR. INTERRELAŢII CU ALTE VITAMINE

Efectul antioxigen. Datorită capacităţii mari de fixare a oxigenului, tocoferolii manifestă *efecte antioxigen*, de protejare a diferiţilor compuşi (lipide, vitamine) faţă de alterările produse prin oxidare, *in vitro* şi *in vivo*.

Cercetările *in vitro* arată că grăsimile care conţin acizi graşi nesaturaţi suferă procesul de rîncezire *(a se vedea capitolul 1.2.3.1.1)*, apreciat prin cantitatea de O_2 fixată de către grăsimi. În prezenţa tocoferolilor se înregistrează un „timp de latenţă", cînd fixarea O_2 de către grăsimi este mai mică (O_2 oxidează preferenţial tocoferolii), şi, în continuare, o pantă în ascensiune, după „epuizarea" tocoferolilor, cînd are loc oxidarea acizilor graşi *(fig. 2.28.A)*. Efectul antioxigen al tocoferolilor poate fi prelungit prin adăugarea unor antioxidanţi sinergici: acid ascorbic *(fig. 2.28 B)*, acid citric etc., care servesc ca sursă de H, contribuind la regenerarea antioxidantului propriu-zis (tocoferoli).

Cu privire la mecanismul de acţiune al antioxidanţilor sinergici *in vivo* este menţionat că, deşi ei nu prezintă asemănări structurale cu tocoferolii, au totuşi proprietatea de a proteja animalele faţă de unele manifestări ale carenţei vitaminei E. Astfel, *acidul ascorbic* previne encefalomalacia şi diateza hemoragică, dar nu protejează vitamina A hepatică; *acidul nordihidroguaiaretic* [NDGA-4,4'-(2,3-dimetiltetrametilen)dipirocatecol, antioxidant industrial], protejează animalele faţă de diateza exsudativă şi vitamina A din ficat; *antabus*/bis(dietiltiocarbamil)-disulfura/, utilizată în cura de dezintoxicare alcoolică, protejează şobolanul faţă de „îmbrunirea grăsimilor" şi puiul de găină faţă de diateza exsudativă, dar nu faţă de encefalomalacie; *albastrul de metilen* (clorura de metil-thionină) are un spectru larg de acţiuni similare vitaminei E şi protejează animalele carenţate în vitamină E faţă de depletiţia vitaminei A din ficat, faţă de peroxidarea grăsimilor, de hemoliza prin aloxan, faţă de diateza exsudativă, encefalomalacie şi de tulburările de reproducere (sterilitate), dar este fără efect asupra distrofiei musculare.

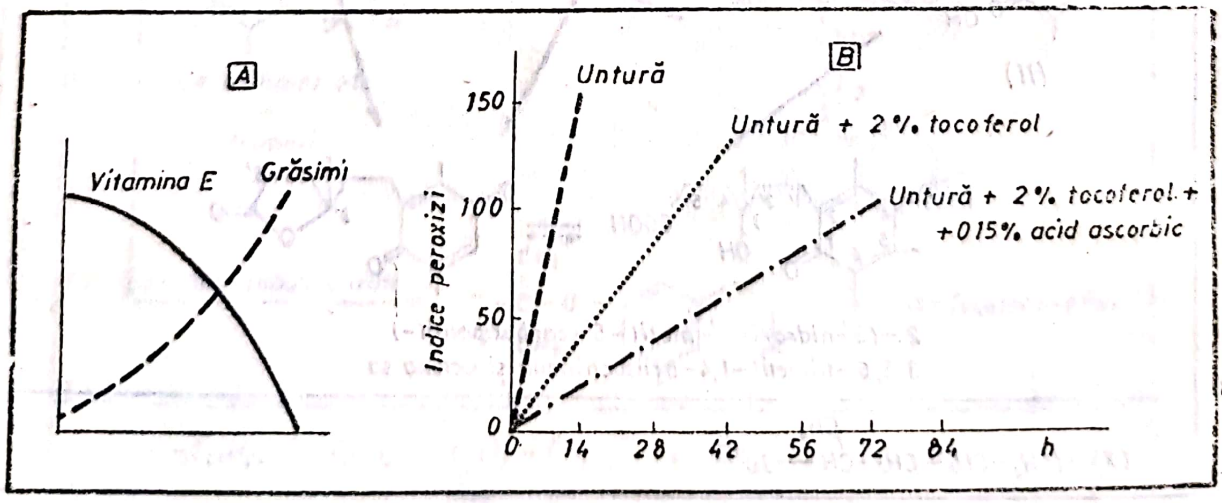


Fig. 2.28. A. Efectul vitaminei E de protejare a oxidării grăsimilor. B. Efectul de protejare faţă de rîncezire a grăsimilor (untură) în prezenţa α-tocoferolului şi respectiv a acestuia plus vitamina C (după O. S. Privett, F. W. Quackenbush, 1954).

S-a sugerat că vitamina E şi alţi antioxidanţi din alimente (acidul ascorbic) ar fi implicaţi în protejarea ţesuturilor plămînilor faţă de agresiunea oxidanţilor din aerul poluat (cu „smog"). Într-adevăr, şobolanii carenţaţi în vitamină E erau mai susceptibili decît cei suplimentaţi cu tocoferoli, la efectele nocive ale ozonului şi bioxidului de azot, care fac parte din oxidanţii aerului poluat; se pare că mecanismul lezional al toxicităţii O_3 ar fi legat de procesul peroxidării lipidelor.

Rolul în oxidoreducerile celulare. Observaţiile iniţiale au semnalat în carenţa vitaminei E intensificarea oxidărilor celulare, care preced distrofia musculară şi care au fost atribuite oxidării acizilor graşi polienici. Ulterior, s-a înregistrat scăderea raportului P/0 *(Martius)* şi s-a considerat că tocoferolii sînt implicaţi în sistemul enzimelor respiratorii (de exemplu, NADH-citocrom C-reductaza) şi că în prezenţa lor are loc cuplarea fosforilării oxidative, iar în lipsa lor o creştere a oxidărilor mitocondriale, fără înmagazinarea energiei în ATP.

Notînd cu AH_2 un donor de H (substrat care se oxidează la A) şi cu B un acceptor (care se reduce la BH_2), participarea tocoferolilor în fosforilarea oxidativă s-ar putea schematiza în următoarele reacţii:

1. Oxidarea tocoferolului, reducerea substratului şi formarea ATP:

$$\alpha\text{-TOCOFEROL} + B + ADP + P_i \rightarrow \alpha\text{-TOCOFEROL(HIDRO)CHINONA} + ATP + BH_2;$$

2. Regenerarea tocoferolului pe seama oxidării substratului (redus) şi a formării apei:

$$\alpha\text{-TOCOFEROL(HIDRO)CHINONA} + AH_2 \rightarrow \alpha\text{-TOCOFEROL} + A + H_2O;$$

3. Reacţia globală:

$$AH_2 + B + ADP + P_i \longrightarrow A + BH_2 + ATP + H_2O$$

$$\alpha\text{-TOCOFEROL} \rightleftarrows \alpha\text{-TOCOFEROL(HIDRO)CHINONA}$$

Participarea în metabolismul ţesutului muscular. Tocoferolii joacă un rol complex în biochimismul ţesutului muscular: în oxidări şi fosforilarea oxidativă; în metabolismul creatinei şi formarea fosfagenului (P-creatină, compus macroergic). În carenţa vitaminei E se constată incapacitatea muşchiului de a transforma creatina în fosfagen, cu scăderea acestuia din muşchi, dar cu creşterea creatinei urinare. Creşterea raportului creatină/creatinină urinară este un indicator biochimic preţios, fiind un semn precoce al carenţei, care precede manifestările clinice. O semnificaţie similară o are şi apariţia ribozofosfatului în urină (pentozurie).

În avitaminoza E se instalează o distrofie musculară caracterizată prin alterarea muşchilor striaţi (scheletici), multiplicarea nucleilor sub sarcolemă şi scăderea glutamic-oxalacetic-transaminazei (GOT); în ser situaţia este inversă, GOT fiind crescută la animalele şi copiii cu distrofii musculare; deoarece această comportare apare şi în distrofiile musculare independente de vitamina E se consideră mai mult o consecinţă a leziunilor musculare decît o manifestare caracteristică a deficitului tocoferolilor. Carenţa vitaminei E afectează mitocondriile

Scanned with OKEN Scanner

și produce fragilitatea lizozomilor, cu creșterea eliberării hidrolazelor acide care intensifică procesele de catabolizare a componenților celulari (proteine, mucopolizaharide, acizi nucleici), concurînd astfel la instalarea distrofiei musculare.

Mușchiul inimii conține 1,5 μM tocoferoli/g (sub formă de chinone și hidrochinone), ceea ce reprezintă o cantitate dublă față de citocromul c, sugerînd astfel rolul important în metabolismul cardiac; în carența de vitamină E se produce o alterare a mușchiului inimii, care poate provoca moartea animalelor (cobai, iepuri), prin insuficiența miocardului.

În carența vitaminei E se înregistrează și alterări ale *țesutului conjunctiv*, cu afectarea fibrelor de colagen (scăderea interacțiunilor dintre lanțuri) și ale *substanței fundamentale*, cu creșterea permeabilității vaselor de sînge, sugerînd astfel utilizarea tocoferolilor în prevenirea bolilor cardiovasculare.

Implicarea în formarea unor pigmenți anormali. În carența vitaminei E apar o serie de pigmenți anormali, în paralel cu creșterea indicelui de peroxizi din țesutul sau organul respectiv. În mușchii animalelor cu distrofie musculară și în inima umană cu atrofie senilă s-a pus în evidență un pigment galben-brun (anormal), care conferă mușchiului o culoare brun-închisă, cu fluorescență în lumina *Wood* (în U.V.) și care ar indica inițierea afectării miofibrilelor.

La animalele carențate în vitamină E supuse unui regim bogat în acizi grași polinesaturați sau AGE (ulei de ficat de morun), țesutul adipos primește o culoare galben-brună, corelată cu prezența peroxizilor. Pigmentul, constituit dintr-o componentă solubilă și una insolubilă în solvenții lipidelor, se colorează puternic cu fuxină și pare a fi identic cu *„ceroidul"* din ficatul șobolanilor hrăniți cu o dietă foarte bogată în acizi grași polinesaturați (carențați sau nu în vitamină E), cu pigmentul din uterul șobolancei carențată în vitamină E și din distrofiile musculare menționate.

Rolul în hematopoeză și în stabilitatea eritrocitelor. Observațiile pe primate au arătat că la maimuță simptomul cel mai constant al carenței vitaminei E, după distrofia musculară, este anemia macrocitară care cedează rapid la administrarea vitaminei E. În carențele vitaminei E la om și maimuță (primare sau secundare malabsorbției din steatoree), T1/2 (semidurata vieții) eritrocitelor marcate cu ^{51}Cr este numai jumătate față de normal. De asemenea, se înregistrează o corelație strînsă între concentrația vitaminei E și stabilitatea eritrocitelor: la o tocoferolemie normală (peste 0,5 mg %), hemoliza produsă prin H_2O_2 (0,12 vol %) nu depășește 10%; în carența vitaminei E (tocoferolemia 0,2—0,3 mg %), gradul hemolizei crește la 40—50% și tinde să se apropie de 100%, prin scăderea mai accentuată a tocoferolemiei.

La prematuri și la nou-născuții subponderali, hrăniți artificial (cu aport insuficient de vitamină E), se constată un sindrom carențial caracterizat prin hipotocoferolemie, anemie, T1/2 al eritrocitelor scăzut, reticulocitoză, edem și tulburări ale pielii, care cedează la administrarea a 75—100 U.I. vit. E/zi *(J. H. Ritchie și colab., 1968)*. La nou-născuții care au făcut icter în primele 7 zile de la naștere s-a constatat, în sîngele cordonului ombilical, o hipotocoferolemie, cu 36% mai scăzută, o hemoliză, cu 74% mai intensă față de normali și o rezistență scăzută a eritrocitelor la soluții foarte diluate de saponină (1 : 250.000), sugerînd că deficiența congenitală de tocoferol contribuie la apariția icterului neonatorum sau constituie un factor favorizant *(I. Gonțea, 1971)*.

În mecanismul biochimic al afectării eritrocitelor se incriminează, în primul rînd, prezența peroxizilor, deoarece nivelul acestora reflectă adesea gravitatea alterărilor. Se consideră că în hipotocoferolemia pronunțată, acizii grași polienici

Scanned with OKEN Scanner

(AGE), din stroma lipoproteică a hematiilor, se transformă în peroxizi, sub influenţa acţiunii oxidante a hemoglobinei şi, astfel, rezistenţa eritrocitelor la liză scade. Susceptibilitatea eritrocitelor la hemoliză depinde, însă, şi de capacitatea de apărare a eritrocitelor, care se datoreşte, în mare măsură, catalazei. Inactivarea acestei enzime prin preincubarea eritrocitelor cu 2,4-diclorfenol (60 minute) a suprimat rezistenţa la hemoliză, în soluţii diluate de H_2O_2, şi adăugarea catalazei pure a contracarat efectul hemolizant; la noul născut, intensitatea hemolizei (în condiţii identice) variază invers proporţional cu conţinutul în catalază eritrocitară. Alte cercetări relevă că măduva osoasă, recoltată de la maimuţele carenţate în vitamină E, sintetizează din acidul α-cetoglutaric + glicocol mai puţine porfirine şi că 90—95% din acestea sînt protoporfirine şi numai 5—10% coproporfirine; de asemenea, concentraţia intermediarului, acidul δ-aminolevulinic (δ-ALA) era mai mică şi producţia sa de 6 ori inferioară, *in vitro*, *pe* măduva animalelor carenţate faţă de animalele martor. Faptul că adăugarea vitaminei E *in vitro*, la măduva provenită de la animalele carenţate, nu creşte cantitatea de δ-ALA şi porfirine, în timp ce *in vivo* normalizează sinteza hemului, relevă că tocoferolii nu intervin direct, ci prin intermediul enzimelor care activează acest sistem şi/sau prin alte mecanisme implicate în hemoglobinogeneză.

Corelaţia cu seleniul şi cu „factorul 3". Şobolanii supuşi unui regim sărac în proteine şi, în special, în aminoacizii cu sulf, manifestă o necroză hepatică masivă *(K. Schwarz şi colab., 1954)*; carenţa vitaminei E o agravează, în timp ce adăugarea sa, o previne. La şobolanii supuşi dietei menţionate, leziunile hepatice fatale se manifestă brusc, în decurs de cîteva ore, dar numai după o perioadă de latenţă (aproximativ 45 zile), lipsită de simptome caracteristice. Cercetări efectuate pe felii de ficat, prelevate cu cîteva săptămîni înaintea apariţiei necrozei, arată un aspect histologic normal, dar relevă alterări biochimice: un timp de respiraţie (C : O) mai scurt, în aparatul Warburg, şi un deficit al căilor metabolice majore în utilizarea „acetatului activ" ($CoA—S—COCH_3$) şi anume: cetogeneza, lipogeneza şi oxidarea la CO_2, sugerînd o stare *„prenecrotică"* (evidenţiată prin alterarea indicatorilor biochimici, fără alte simptome).

Deoarece lipsa *„factorului 3 al lui Schwarz"*, un compus care conţine seleniu activ, a cisteinei (probabil prin impurităţile de Se pe care le conţine) sau lipsa numai a vitaminei E determină doar boli cronice moderate, în timp ce deficitul lor simultan aduce după sine leziuni tisulare (hepatice) grave şi moartea şi faptul că factorul 3 sau vitamina E singure nu pot proteja animalele, sugerează că necroza hepatică prin deficit de proteine alimentare este determinată de lipsa simultană şi a factorului-3-seleniu şi a vitaminei E.

Tocoferolii şi seleniul (care poate înlocui, parţial, vitamina E în carenţă) ar avea ca acţiune comună menţinerea la un nivel ridicat a ubichinonei (coenzima Q), factor important în lanţul oxidoreducerilor celulare *(D. Green)*, deşi nu sînt excluse nici alte mecanisme.

Interacţiuni cu alte vitamine. În dependenţă de raportul dintre *vitamina A* şi vitamina E se înregistrează efecte favorabile sau defavorabile organismului. Astfel, în regimul carenţat în vitamină E, dozele relativ ridicate de vitamină A (240 mg/kg greut. corp.) asigură creşterea, dar nu corectează hipotocoferolemia; administrarea unor cantităţi excesive de vitamină A scade rezervele de vitamină E din ţesuturi şi favorizează apariţia hipovitaminozei E, considerîndu-se că hipervitaminoza A determină o creştere a necesităţilor în vitamină E. În schimb vitamina E manifestă efecte de protejare a vitaminei A atît *in vitro* (o apără

Scanned with OKEN Scanner

față de distrugerea prin lumină, oxidanți etc.) cît și în organism (ficat); în carența vitaminei E, rezervele hepatice ale vitaminei A sînt mult mai scăzute; în general, necesitățile în vitamină A ale șobolanului tînăr sînt mai reduse în cazul excesului de tocoferoli *(A. W. Davies, T. Moore, 1941, 1950; T. Terroine, 1956, J. T. King, 1965; C. E. Tobin, 1970)*.

Este necesară semnalarea impactului triplu, complex, între vitamina E, A și F (AGE), cu multiple implicații, în special asupra necesarului fiecărei din aceste vitamine, în dependență de celelalte *(a se vedea 2.1.2.2.2.; 2.1.4.5.2; 2.1.5)*.

Cantitățile exagerate de tocoferoli scad rapid nivelul *vitaminei* B_1 libere (tiamină) din ficatul uman; la șobolani, administrarea vitaminei B_1 vindecă simptomele distrofiei musculare prin carența vitaminei E; se consideră că șobolanii carențați în vitamină E necesită un aport crescut de vitamină B_1 *(L. D'Agostino, 1945; M. Aloisi, V. Polany, 1960)*.

La șoarecii dublu carențați, în *vitamină* B_6 *și E*, administrarea vitaminei B_6 determină creșterea în greutate, care nu se observă la administrarea vitaminei E singure, dar aceasta previne leziunile musculare *(N. Y. Makenzie, 1959; J. S. Dinning, 1965)*.

Vitamina C manifestă acțiuni protectoare asupra apariției simptomelor carenței vitaminei E, iar aceasta din urmă, chiar la om, are un efect de cruțare a vitaminei C din organism (scăderea excreției acidului ascorbic urinar, cu un maxim la 2 ore după administrarea *per os* a unei doze de 12 mg DL—α—tocoferol). La fel, regenerarea hemoglobinei la animalele anemiate este maximă la administrarea simultană a vitaminei E + C + fier. față de administrarea numai a unuia sau a cîte doi din acești factori *(L. D'Agostino, 1945; L. Zaccharias și colab., 1970; Martin, D. W. și colab., 1983)*.

Acțiuni antimicrobiene. Tocoferolii au un efect de protecție antimicrobiană, relevat experimental prin scăderea rezistenței animalelor carențate în vitamină E față de infecția cu *Brucella abortus bovi* sau *Micobacterium tuberculosis bovis* și argumentată în plus cu ocazia unei epidemii a *„bolii Bang"* la vite (Elveția), manifestată prin scăderea fertilității (pierderea sarcinii) și care a cedat la administrarea vitaminei E, respectiv a furajelor bogate în această vitamină.

2.1.4.5. *HIPO- ȘI AVITAMINOZA E*

Carența vitaminei E afectează atît organismul matern cît și cel fetal. Modificările structurale și funcționale ale hipofizei, care secretă hormoni ce stimulează activitățile celorlalte glande, duc la o secreție scăzută de hormoni gonadotropi absolut necesari evoluției normale a funcțiilor de reproducere; în plus, se consideră că tocoferolii potențează și direct efectele acestor hormoni prin creșterea sensibilității receptorilor din organele genitale față de hormonii hipofizari. Vitamina E este implicată în biosinteza acizilor nucleici (încorporarea ^{32}P) și în diviziunea celulelor care stau la baza dezvoltării produsului de concepție cu membranele sale. Carența în vitamină E afectează cu prioritate structurile mezodermale, împiedicînd dezvoltarea sistemului hematopoetic (insule sanguine) cu consecințe în inaniția și asfixia fătului.

Unele dintre manifestările carenței vitaminei E se atribuie prezenței grăsimilor alterate și respectiv a peroxizilor: diateza exsudativă, care afectează în

Scanned with OKEN Scanner

special ţesutul adipos, muşchii şi pielea puilor, debutează cu hemoragii discrete, apoi plasma difuzează prin capilare în toată regiunea atinsă, exudatul avînd culoare verzuie (datorită produşilor de degradare ai hemoglobinei); encefalomalacie; liza globulelor roşii; producerea unor pigmenţi anormali. Alterările muşchilor, par mai puţin dependente, şi tulburările aparatului genital şi de reproducere la ambele sexe, independente de alterarea grăsimilor.

2.1.4.5.1. CARENŢA VITAMINEI *E* LA ANIMALE

Efectele carenţei vitaminei E la *şobolancă* se manifestă gradat şi progresiv, în raport de perioada de carenţare. Cînd este supusă unui regim carenţat şi fecundată cu un mascul normal, o parte din pui se nasc morţi, iar ceilalţi mor la scurt timp deoarece şobolanca nu-i îngrijeşte; aceasta este o formă uşoară, cu fenomene reversibile, care cedează la administrarea vitaminei E; dacă se continuă carenţarea, leziunile devin ireversibile şi şobolanca pierde capacitatea de reproducere şi manifestă şi alte simptome ale carenţei (musculare).

Puii de şobolan (femele), carenţaţi de la naştere, par a avea la vîrsta maturităţii sexuale, oestrul, ovulaţia şi fertilitatea normale. Semnele carenţei devin manifeste în timpul graviditătii; din ziua a 8-a ating evoluţia placentei, iar în ziua a 13-a are loc resorbţia fătului (abort); pînă la această fază alterările sînt reversibile. Continuarea carenţării duce la agravarea leziunilor şi, pe lîngă sterilitate (ireversibilă), se instalează o miopatie progresivă şi tulburări nervoase, care pot duce la moarte.

La *şobolanul mascul* apar alterări ale testiculului şi elementelor liniei seminifere, cu fuziunea spermatozoizilor, care se „umflă", se strîng în grămezi şi apoi dispar; în continuare se observă alterări ale cromatinei nucleelor spermatidelor şi spermatocitelor II, şi, final, formarea unor plasmode voluminoase (25—50 μ) şi 20—40 nuclee, în parte lizate. La animalele impubere parenchimul testicular nu prezintă la început decît modificări minime, dar în cîteva săptămîni leziunile devin ireversibile şi nu cedează la administrarea vitaminei E şi din acest motiv şobolanii masculi nu sînt indicaţi pentru testarea vitaminei E *(M. Cornier, 1962)*. În plus, apar tulburări nervoase, cu scleroza măduvii spinării, pareze, ataxie a trenului posterior, tremurături ale corpului, tulburări ale cronaxiei etc.

Alte specii se comportă diferit, înregistrîndu-se numai unele din tulburările ce apar la şobolan. La iepure, oaie, capră, cobai, predomină atrofia musculară.; la cîini se observă distrofii musculare şi atrofia testiculilor, în timp ce pisica nu este, aparent, afectată de lipsa vitaminei E. La găinile carenţate se constată alterări musculare şi embrionii din ouăle lor nu sînt viabili. La puii de găină carenţaţi din momentul ecloziunii se instalează, din săptămîna a 3-a, encefalomalacia cu ataxie, care se vindecă spontan sau duce la moarte; la autopsie, se observă, în creier, focare de ramolisment şi hemoragice. Se pare că albinele hrănite special cu vitamină E devin matcă („regine").

2.1.4.5.2. *NECESITĂŢILE ŞI CARENŢA VITAMINEI E LA OM*

La om, deşi nu se cunosc carenţe specifice, se consideră, totuşi, posibilitatea ca lipsa vitaminei E să determine unele forme de sterilităţi carenţiale (depopularea, prin scăderea natalităţii, din unele regiuni subalimentate) şi afecţiuni musculare şi hepatice, cu repercusiuni asupra altor vitamine. Acestea duc final la stări policarenţiale, în care simptomele altor avitaminoze pot masca pe cele cauzate de hipo- sau avitaminoza E.

Stările patologice caracterizate prin malabsorbţii, ca steatoreea, fibroza chistică, atrezia biliară, sprue nontropical şi pancreatita cronică, sînt însoţite de alterări ale testelor de laborator care pledează pentru o carenţă a vitaminei E.

Cu toate că necesitatea ca omul să primească tocoferolii din mediul extern (alimente) este certă, totuşi, aportul optim nu este perfect stabilit. În regimul cu 3 mg α-tocoferol/zi se înregistrează semnele biochimice ale carenţei: hipotocoferolemie, susceptibilitatea crescută a eritrocitelor la hemoliză şi creşterea creatinei, care nu apar la 7 mg/zi (0,1 mg/zi gr. corp), considerată astfel ca aport

necesar (unii recomandă cantităţi duble). Aceste valori sînt arbitrare, deoarece necesităţile reale trebuie apreciate în dependenţă de aportul în acizi graşi polinesaturaţi (AGE), în special acid linoleic, deoarece aceştia cresc semnificativ necesităţile în vitamină E. Cercetări pe voluntari (urmărite timp de 5 ani) arată că în regimul sărac în AGE este suficient un aport de 5 mg tocoferoli pe zi; consumul exagerat de AGE (60—70 g/zi), însoţit de creşterea conţinutului de linoleat din ţesutul adipos (30—50% din totalul acizilor graşi, faţă de 10%, normal), măreşte de 4—5 ori necesităţile în vitamină E. Aportul de AGE, în condiţii normale, pare a fi singurul factor important în modularea necesităţilor în vitamină E, raportul optim fiind apreciat la 0,6 mg α-tocoferol/g AGE *(L. A. Witting, 1972)*. Excesul de acizi graşi polinesaturaţi se oxidează uşor, cu formare de peroxizi şi inactivează *in vitro* o parte din vitamina E alimentară; *in vivo* se acumulează în ţesuturi (aproximativ 50 g acid linoleic/organism uman) şi creşte, prin ambele efecte, necesităţile în vitamină E, unul din principalii antioxidanţi biologici.

În cursul sarcinii apare o creştere progresivă a tocoferolemiei, care, în ultima lună, este cu 50—100% mai mare decît în primul trimestru sau la negravide. Indiferent de vîrsta sarcinii, tocoferolemia este mai scăzută în timpul primăverii decît în restul anului (situaţia este generală şi pentru bărbaţi şi pentru femeile negravide), dar nivelul său este puternic influenţat de aportul alimentar (cantităţile sub 8 mg/zi limitează creşterea tocoferolemiei la gravide). La femeile gravide cu avort habitual, valoarea tocoferolemiei este de 2—4 ori mai mică decît la cele care duc sarcina la termen; administrarea unui surplus de vitamină E în timpul graviditătii reduce considerabil incidenţa avortului. În acest sens, pledează observaţiile că administrarea zilnică a vitaminei E (3—6 ml ulei de germeni de grîu), de la începutul graviditătii, a făcut ca 75—85% dintre femeile care au avut 2—3 avorturi în antecedente să dea naştere la copii viabili şi, respectiv, ca la gravidele supuse regimului bogat în vitamină E, procentul avorturilor să fie de 5 ori şi al naşterilor premature de 2 ori mai scăzut decît la grupurile de control.

Creşterea tocoferolemiei la gravide, reprezentînd o particularitate metabolică a sarcinii şi constituind o condiţie favorabilă pentru evoluţie respectiv pentru dezvoltarea fătului, este necesară asigurarea unui minimum de 10—12 mg vitamina E/zi. În 2—5 luni după naştere, tocoferolemia revine la valorile bazale, concomitent cu excreţia prin lapte, care conţine 1 mg% vitamină E. În consecinţă, femeia care alăptează transferă sugarului 8—12 mg vitamină E/zi, care, adăugată la cerinţele sale proprii, ridică necesităţile la 15—20 mg/zi, pe toată perioada alăptării.

Un fapt important este că noul născut este sărac în vitamină E, tocoferolemia sa (din sîngele cordonului ombilical) fiind de 3—6 ori mai mică decît a mamei (din vena cubitală). Acest deficit nu se datoreşte unei insuficienţe de aprovizionare prin placentă, ci consumului mai mare al fătului; conţinutul de tocoferoli din sîngele (artere) care se întoarce prin cordon de la făt la mamă este cu aproximativ 40% mai redus decît cel primit (prin vene). În mod normal, prin aportul laptelui matern, tocoferolemia sugarului de 2—3 luni se apropie de nivelul minim al adultului. Deoarece conţinutul în tocoferoli a laptelui de vacă este de 10—12 ori mai mic decît a celui matern, la sugarii hrăniţi artificial se menţine hipotocoferolemia, iar la prematuri, a căror necesităţi în vitamină E sînt *per se* mai mari, ea se accentează. Pentru asemenea situaţii se recomandă un aport de 8—12 mg tocoferoli/zi şi după normalizare, de 5—6 mg/zi. Deoarece alimen-

Scanned with OKEN Scanner

tele comerciale folosite în locul laptelui matern conţin o cantitate mică de vitamină E faţă de AGE, consumarea lor, fără instituirea unor măsuri speciale, poate duce la apariţia edemului şi la anemie hemolitică, în special la prematuri.

2.1.4.6. *INDICAŢII TERAPEUTICE. HIPERVITAMINOZA E*

Preparatele de vitamină E sînt utilizate în afecţiunile ginecologice şi obstetricale: tulburări de menopauză (palpitaţii, transpiraţii), amenoree, oligomenoree, sterilitate, iminenţă de avort şi avort spontan, prurit vulvar, toxicozele şi vomismentele gravidelor; în îngrijirea prematurilor; la bărbat, în sterilitate: azoo-, micro- şi oligospermie, criptorchidie; în afecţiunile dermatologice (acnee, psoriasis, sclerodermie); în prevenirea şi terapia bolilor cardiovasculare: ateroscleroză, insuficienţă cardiacă, infarct cardiac, angină pectorală (ameliorează crizele de angor, permiţînd reducerea marcată a dozelor de nitroglicerină, *R. W. Jones* şi colab., *1961*); în leziunile hepatice cronice, respectiv în hepatita epidemică; în distrofiile musculare, boala *Dupuytrenne* (indicaţie majoră); în reumatismele musculare; encefalopatie; sindroamele hemoragice, tromboflebite; ulcere varicoase; unele forme de anemii la copii etc.

Hipervitaminoza E. Deşi cantităţile de pînă la 100 mg/zi nu sînt toxice, administrarea abuzivă a unor cantităţi mari de tocoferoli poate duce la tulburări ale ciclului, involuţia ovarelor, afecţiuni nervoase, dureri ale membrelor inferioare, iar prin administrarea timp îndelungat, la fenomene toxice de acumulare (azoospermia la bărbaţi).

2.1.5. ACIZII GRAŞI ESENŢIALI (AGE) VITAMINA F

Şobolanii hrăniţi cu dietă alipidică manifestă *„boala de carenţă a grăsimilor"*, caracterizată prin stagnarea creşterii, tulburări cutanate, de reproducere, hepatice şi renale şi care pot fi evitate (parţial vindecate) prin grăsimi bogate în *acizi graşi polinesaturaţi: linoleic, linolenic, arachidonic (cap. 1.2.2.; Tabelul 1.10)* şi care au fost denumiţi *vitamina F*, litera care urma, cronologic, după descoperirea vitaminei E *(G. O. Burr, M. M. Burr, H. M. Evans, 1928—1929)*.

Datorită faptului că organismul uman (şi animal) este capabil să sintetizeze numai acizii graşi saturaţi şi cu o dublă legătură, dar nu poate sintetiza *de novo* acizii graşi polinesaturaţi, ci doar să producă o alungire a lanţurilor preexistente, fiind astfel tributar aportului exogen şi că apar modificări carenţiale caracteristice ei ar putea fi consideraţi ca „vitamine". Totuşi, o serie de particularităţi nu corespund încadrării lor în grupa vitaminelor: cantităţile mari din alimentaţia uzuală (10—20 g/zi şi din organism (500 g); rolul lor energetic şi structural au făcut să fie cuprinşi în grupa „vitagene". Deoarece această noţiune este destul de neprecisă şi nu este unanim acceptată se preferă definirea lor ca *„acizi graşi esenţiali"* sau AGE prin asemănare cu noţiunea de acizi aminaţi esenţiali (AAE).

2.1.5.1. *ROLUL BIOCHIMIC AL AGE*

AGE sînt componente ale *fosfolipidelor (cap. 1.2.4)* şi ale altor lipide structurale din membranele şi particulele subcelulare (în carenţa AGE capacitatea organelor şi ţesuturilor de a sintetiza fosfolipidele este mult scăzută), cu multiple implicaţii metabolice.

Organismul în creştere şi ţesuturile în continuă proliferare (piele, spermatocite, cartilaje etc.) manifestă o mare sensibilitate la aportul şi respectiv la carenţa AGE.

Prin participarea în structurarea membranelor mitocondriale şi a enzimelor respiratorii şi prin reactivitatea mare a grupărilor metilenice, AGE intervin în oxidoreducerile celulare. În carenţa AGE, se constată alterări ale mitocondriei (care conţine 20—30% AGE), cu scăderea eficienţei fosforilării oxidative hepatice

Scanned with OKEN Scanner

și respectiv modificări ale enzimelor implicate în oxidoreduceri: succindehidrogenază, glutamicodehidrogenază, citocromoxidază; aceasta din urmă conține 20% AGE, în special sub formă de acid arahidonic, ca parte integrantă a moleculei (îndepărtarea sa inactivează enzima).

Grăsimile cu conținut ridicat în AGE scad nivelul colesterolemiei, probabil prin esterificarea colesterolului cu AGE și eliminarea sub această formă prin bilă. Se menționează corelații între nivelul AGE și geneza ficatului „gras" precum și cu prelungirea timpului de coagulare a sîngelui.

AGE manifestă relații de reciprocitate cu diferite alte vitamine. La o dietă cu 5% acid linoleic se observă o creștere a eliminării urinare a vitaminei B_1, probabil printr-o supraproducție intestinală. Vitaminele B_1, B_6 acidul pantotenic, vitamina E, intervin în menținerea raportului optim dintre acizii grași nesaturați și saturați și previn instalarea carenței AGE *(T. Terroine, 1966; D. M. Greenberg și colab., 1970)*.

AGE prezintă o importanță deosebită ca precursori ai *prostaglandinelor*

2.1.5.2. *CARENȚA AGE. NECESITĂȚI. INDICAȚII*

Simptomele carenței la animalele (șobolani) supuse unui regim lipsit de AGE (vitamina F) de la naștere, se instalează progresiv. În prima lună, animalele se dezvoltă normal, dar după 8—10 săptămîni creșterea încetează. În această perioadă încep să apară dermatite, caracterizate prin îngroșări eczematoase descuamative (îngroșarea stratului cornos, înmulțirea mitozelor) și creșterea permeabilității pielii. Leziunile se extind pe tot corpul, dar mai ales pe labe și coadă, cu rărirea și căderea blănii și apariția unor zone roșii-violacee, acoperite cu pelicule; coada devine și ea pelicoasă și cade (necroză amputativă). Din luna a 3-a se înregistrează afectarea aparatului genital, cu scăderea capacității de reproducere: la femele, alterări ale ciclului și ovulației, prelungirea timpului de graviditate, nașterea puilor morți, lactația deficitară, iar la masculi, atrofia testiculară cu degenerarea celulelor germinative, mergînd pînă la azoospermie. În plus, animalele prezintă o rezistență scăzută la stresuri și tulburări ale tractului gastro-intestinal (cu afectarea absorbției lipidelor și vitaminelor liposolubile), ale ficatului (hepatosteatoză cu creșterea puternică a conținutului în colesterol); fragilitatea capilarelor; alterarea cartilajelor de conjugare; ale aparatului renal, cu arii necrozate și hematurie, care pot duce la moartea animalului.

Determinarea AGE se face prin metodele aplicate lipidelor *(cap. 1.2.3.1.1; 1.2.2.)*; cele mai bune rezultate se obțin prin gazcromatografie, precum și prin teste biologice care urmăresc prevenirea sau vindecarea simptomelor carențiale la șobolan.

Un aport de 50—60 mg linoleat/zi previne simptomele carenței; acidul arahidonic este de 3 ori și chiar de 6 ori mai eficient (în testul „creșterii"), pe cînd acidul linoleic are numai 1/2 din activitate.

În aprecierea necesităților trebuie să se țină seama de unele particularități: animalele tinere necesită cantități relative (pe kg greut. corp.) de 2—3 ori mai mari decît cele adulte; cerințele masculilor sînt de 3—5 ori mai mari decît a femelelor, cu excepția perioadei de gestație (cînd necesitățile sînt de 100 mg/zi). Indiferent de condițiile fiziologice, aportul ridicat de colesterol și acizi grași saturați (C_{14-18}) cresc, aproape direct proporțional, necesitățile în AGE.

La om, necesitățile adultului se apreciază la 1,5% (din substanța uscată) din cantitatea alimentelor sau la 2% din valoarea calorică, ceea ce revine la 7—8 g acid linoleic/zi (100 mg/kg greut. corp). Deoarece grăsimile alimentare bogate în AGE (uleiuri vegetale, grăsimi animale, cu conținut ridicat în acid ara-

Scanned with OKEN Scanner

chidonic) şi rezervele proprii mari (aprox. 500 g acid linoleic/70 kg) asigură aprovizionarea cu AGE, carenţele nu apar spontan, ci numai în condiţii deosebite.

Cercetările experimentale, pe voluntari, după un regim carenţat de 3—6 luni, relevă alterarea indicatorilor biochimici: scăderea nivelului AGE din sînge (indicele de iod scade de la valoarea normală de 123 la 93; acidul arachidonic, de la 3,2 la 1,8%) şi, eventual, apariţia primelor simptome carenţiale. O situaţie specială de carenţă AGE se observă în hrănirea îndelungată exclusiv, prin perfuzii *i.v.*, aşa-numita „hiperalimentaţie parenterală" (bogată în aminoacizi, glucide şi ioni anorganici).

Sugarii necesită un aport, relativ, de 2—5 ori mai mare decît adulţii (pe kg greut. corp.). Laptele matern aduce 4—5% acid linoleic (din totalul caloric). La un aport sub 1,3%, la sugarii hrăniţi artificial şi în special cu lapte delipidat, se instalează, pe lîngă alterările indicatorilor biochimici (de ex. scăderea AGE din sînge şi a indicelui de iod) şi tulburări cutanate, cu îngroşări exsudative sau descuamative ale pielii („eczema infantilă"), furunculoză, căderea părului, care cedează la administrarea AGE (de exemplu, linoleat).

Preparatele de AGE *per os* sau în aplicaţii locale sînt indicate în unele forme de eczeme şi dermatite seboreice, furunculoză, psoriasis. Avînd în vedere rolul AGE în troficitatea pielii se utilizează în diferite creme, de unde şi denumirea de *„vitamina cosmeticii"*.

2.1.6. FILOCHINONELE VITAMINELE K. VITAMINELE ANTIHEMORAGICE

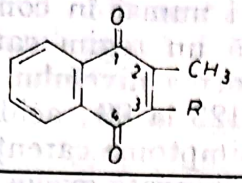
Primele indicaţii asupra vitaminei K au fost întîmplătoare, legate de cercetările asupra metabolismului colesterolului la puii de găină hrăniţi cu regim sintetic şi la care a apărut „boala hemoragipară" sau „sindromul lui Dam", caracterizat prin hemoragii (subcutane, musculare, esofagiene, hepatice, în creier etc.), similare cu cele din avitaminoza C, dar care nu răspundeau la administrarea acidului ascorbic, în schimb, cedau la hrănirea cu plante verzi şi respectiv după administrarea extractelor eterice din acestea *(H. Dam, 1929,; R. G. Mc. Farlane, 1931; Goleanţki, 1933)*. Factorul capabil să vindece aceste hemoragii, însoţite de hipoprotrombinemie, a fost denumit *vitamina coagulării* sau K (*K* = Koagulation). Iniţial s-a considerat ca o carenţă specifică puilor (păsări), dar a fost reprodusă experimental şi la mamifere *(J. O. Graves, C. I. A. Schmid, 1937; H. Dam, Glavind, 1939)* şi recunoscută la om *(E. D. Warner şi colab., 1938)*; predispoziţia mai mare la carenţă a păsărilor se explică prin intestinul lor mai scurt, cu o floră simbiotică mai redusă, or, aceasta are un rol decisiv în aprovizionarea organismului cu vitamine K. Pe lîngă vitaminele K naturale, cu structura cunoscută şi confirmată prin sinteze *(P. Karrer, Almquist, Doisy)*, liposolubile, se utilizează în practică şi o serie de vitamine K de sinteză, care nu au corespondent în natură, în majoritate hidrosolubile.

2.1.6.1. *VITAMINELE K NATURALE*

Vitamina K_1 s-a obţinut din *„alfa-alfa"* (o lucernă din Africa) prin extragere cu eter de petrol şi cromatografie pe coloane adsorbante (cu permutit, cărbune animal), care fixează vitaminele K *(Doisy)*; clorofila, abundentă, se elimină prin adsorbţie pe $ZnCO_3$. *Vitamina* K_2 s-a obţinut din făina de peşte (putrezită) fiind produsă de către microorganisme *(W. D. Corquadale şi colab., 1939)*.

Vitaminele K naturale au un nucleu de bază comun: *2-metil-1,4-naftochinona* şi diferă între ele prin lanţul lateral (R) din poziţia 3 *(fig. 2.29)*.

Vitamina K_1 sau *filochinona:* 3-fitil-2-metil-1,4-naftochinona are ca lanţ lateral R = fitil, cu 20 atomi de C şi o singură dublă legătură (conformaţia

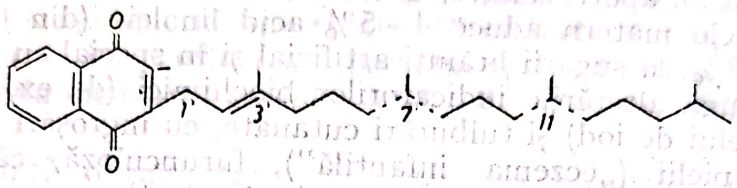


Scheletul de bază

3-R-2-metil-1,4-naftochinona

Vitaminele K_1 = Filochinone

FILOCHINONA $R = C_{20}H_{39} = -CH_2-CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}-[(CH_2)_3-\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}H-]_3-CH_3$

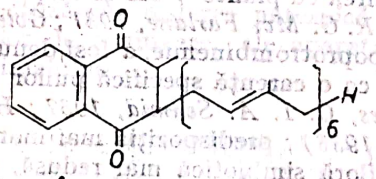


Activitatea în seria vitaminelor K_1

Lanț saturat (R)	Activitate
C_5	<5
C_{10}	10
C_{15}	30
C_{20}	100
C_{25}	80
C_{30}	50

Vitaminele K_2 = Menachinone = Farnochinone

FARNOCHINONA $R = C_{30}H_{39} = -[CH_2-CH=\overset{CH_3}{\overset{|}{C}}-CH_2]_6H$



Activitatea în seria vitaminelor K_2

Lanț nesaturat (R) poliizoprenic	Activitate
C_{10} = geranil	15
C_{15} = farnezil	45
C_{20} = geranil-geranil	100
C_{25} = geranil-farnezil	120
C_{30} = farnezil-farnezil (difarnezil : scualenil)	100
C_{35} = farnezil-geranil-geranil	70

FTIOCOL R = OH

Fig. 2.29. Vitaminele K naturale și activitatea lor biologică

trans) şi se prezintă ca un lichid uleios ce distilă la presiune între 115—145°C şi cristalizează la —20°C. Tot din acest grup fac parte şi alţi compuşi cu R = = 5 × *n*, în care *n* = 1—6 şi care au o dublă legătură în 2'—3'. Vitamina K_1 se poate obţine sintetic din fitol şi esterul 1-monoacetil-2-metil-1,4-naftochinonă, cu un randament de 65% *(Hischmann şi colab., 1954)*.

Vitaminele K_2 sau *menachinone* au R alcătuit dintr-un număr variat de resturi izoprenice, de unde denumirea generică de „3-multiprenoil-2-metil-1,4-naftochinone"; lungimea lanţului se notează fie prin numărul resturilor izoprenice, fie prin numărul atomilor de C din lanţ, sub formă de indice numeric în paranteze.

Vitamina K_2 *(7 n)* sau $K_{2(35)}$, *farnochinona*, are R = all-transfarnezil-geranil-geranil, p.t. 54°C şi se găseşte în produsele în putrefacţie şi în intestinul gros al omului şi animalelor (origine bacteriană). *Vitamina* K_2 *(6 n)* sau $K_{2(30)}$ cu R = all-trans-difarnezil, s-a obţinut din soluţia din care s-a izolat farnonchinona. Din alte surse naturale s-au obţinut şi celelalte vitamine K_2, de exemplu, K_2(9 *n*) sau $K_{2(45)}$ din bacilul tuberculozei.

Ftiocolul, obţinut tot din bacilul tuberculozei, are cea mai simplă structură dintre produşii naturali, cu R = —OH *(H.Y. Almquist, A. Klose, 1939)*.

Stabilitatea vitaminelor K şi respectiv degradarea şi natura produşilor formaţi depind de condiţiile de lucru şi de mediu: raze U.V., prezenţa sau lipsa O_2, natura solventului, pH *(fig. 2.30)*.

2.1.6.2. *VITAMINELE K DE SINTEZĂ*

Vitamina K_3, *menadiona*, are cea mai simplă structură: 2-metil-1,4-naftochinona *(fig. 2.31)*. Se obţine industrial din 2-metil-naftalină (din gudroanele de cărbune sau prin sinteză), prin oxidare cu acid cromic în mediu acid; cu H_2O_2 sau chiar în curent de aer (randament = 30—60%). Sinteza, de la naftalină trece prin fazele de acid β-naftalen-sulfonic, acid β-naftoic, β-nitril, β-aldehidă, care prin reducerea Clemensen, trece în 2-metil-naftalină şi aceasta se oxidează ca mai sus. Vitamina K_3 *(F.R. VIII)* se prezintă ca o pulbere cristalină, aproape fără gust, de culoare galbenă, care la lumină se descompune şi se colorează; solubilă în 60 p alcool, 10 p benzen şi în uleiurile vegetale; insolubilă în apă, cloroform, tetraclorură de C. În terapie se utilizează şi produşii de adiţie cu bisulfit, hidrosolubili (Synkan, Karan etc.) *(fig. 2.31)*.

Vitaminele K_4 au la bază nucleul 2-metil-1,4-naftohidrochinona. Reprezentantul de bază este *menadiolul* (2-metil-1,4-naftohidrochinona), forma de reducere a menadionei. Prin esterificarea grupelor —OH se obţin o serie de derivaţi de interes terapeutic *(fig. 2.31)*.

Prin substituirea în menadiol a unei grupări —OH cu $-NH_2$ se obţin *vitaminele* K_5 *şi* K_7, iar prin substituirea ambelor, *vitamina* K_6. Aceste vitamine, sub formă de clorhidraţi, sînt hidrosolubile şi se obţin uşor prin sinteză, plecînd de la 2-metil-naftochinonă *(fig. 2.32)*.

***Preparatul farmaceutic** este **vitamina** K_3 **(Menadioni natrii bisulfis; Menaphtoni natrii bisulfis).** pulbere cristalină albă, fără miros, solubilă 1:2 în apă (soluţia 2% are pH = 4,8 — 6,2); puţin solubilă în etanol, practic insolubilă în benzen, cloroform, eter. Este higroscopică şi sensibilă la lumină (coloraţie violetă). Soluţia apoasă nu poate să fie sterilizată prin căldură, deoarece hidrolizează la 2-metil-1, 4-naftochinon-3-sulfonat. Hidroliza are loc în proporţie de 50% în 2 ani şi 6 luni, la*

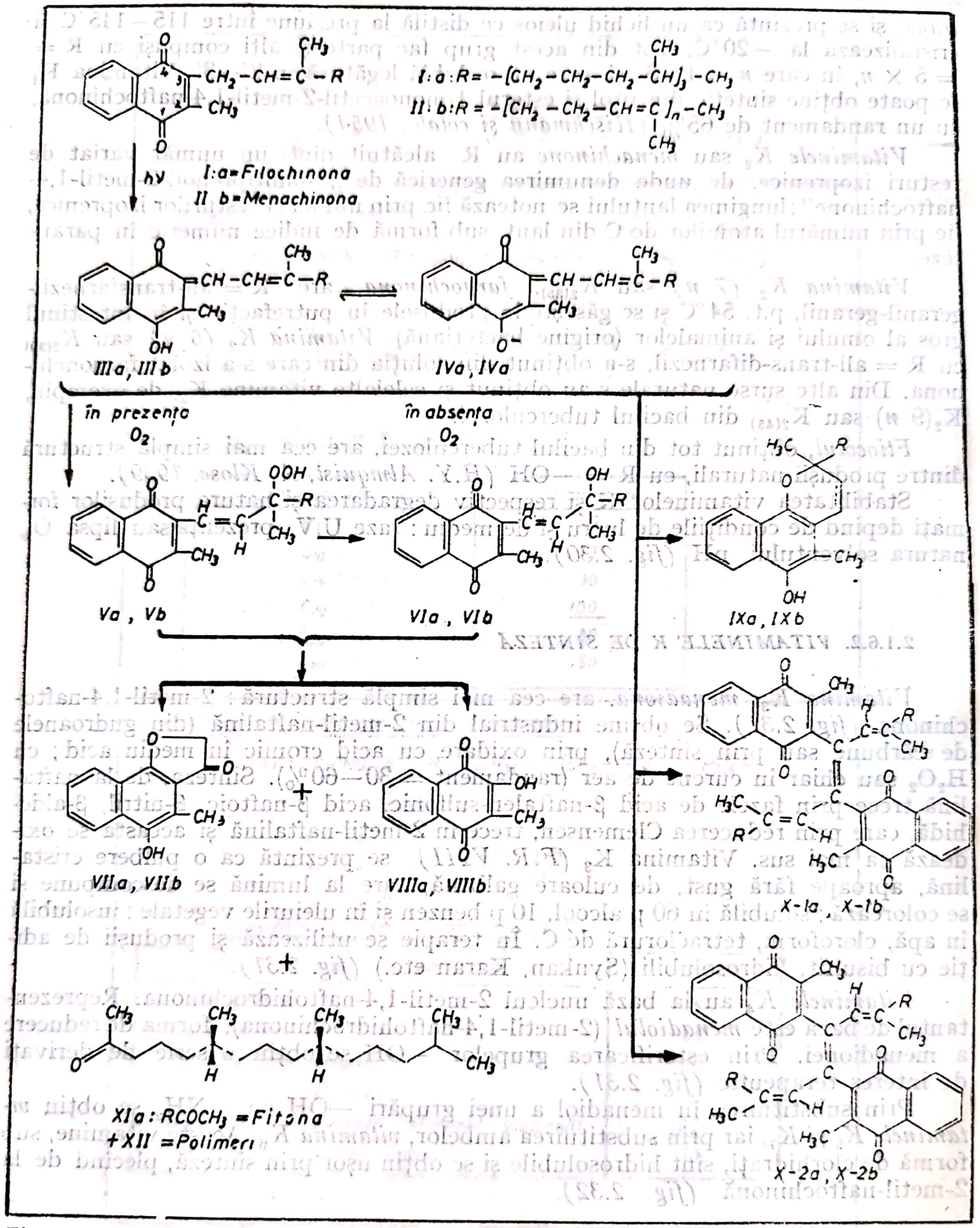


Fig. 2.30. Stabilitatea și degradarea vitaminelor K (după F. Korte, M. Goto, 1977). În vehicul organic sînt stabile; în vehicul anorganic (acid silicic anhidru, silicat de Al etc.) dau produși similari celor obținuți prin iradiere cu U.V. în prezența oxigenului; în soluție apoasă (solubilizare prin surfactanți) sînt stabile la pH acid; în mediu alcalin dau produși similari iradierii în U.V. în absența oxigenului.

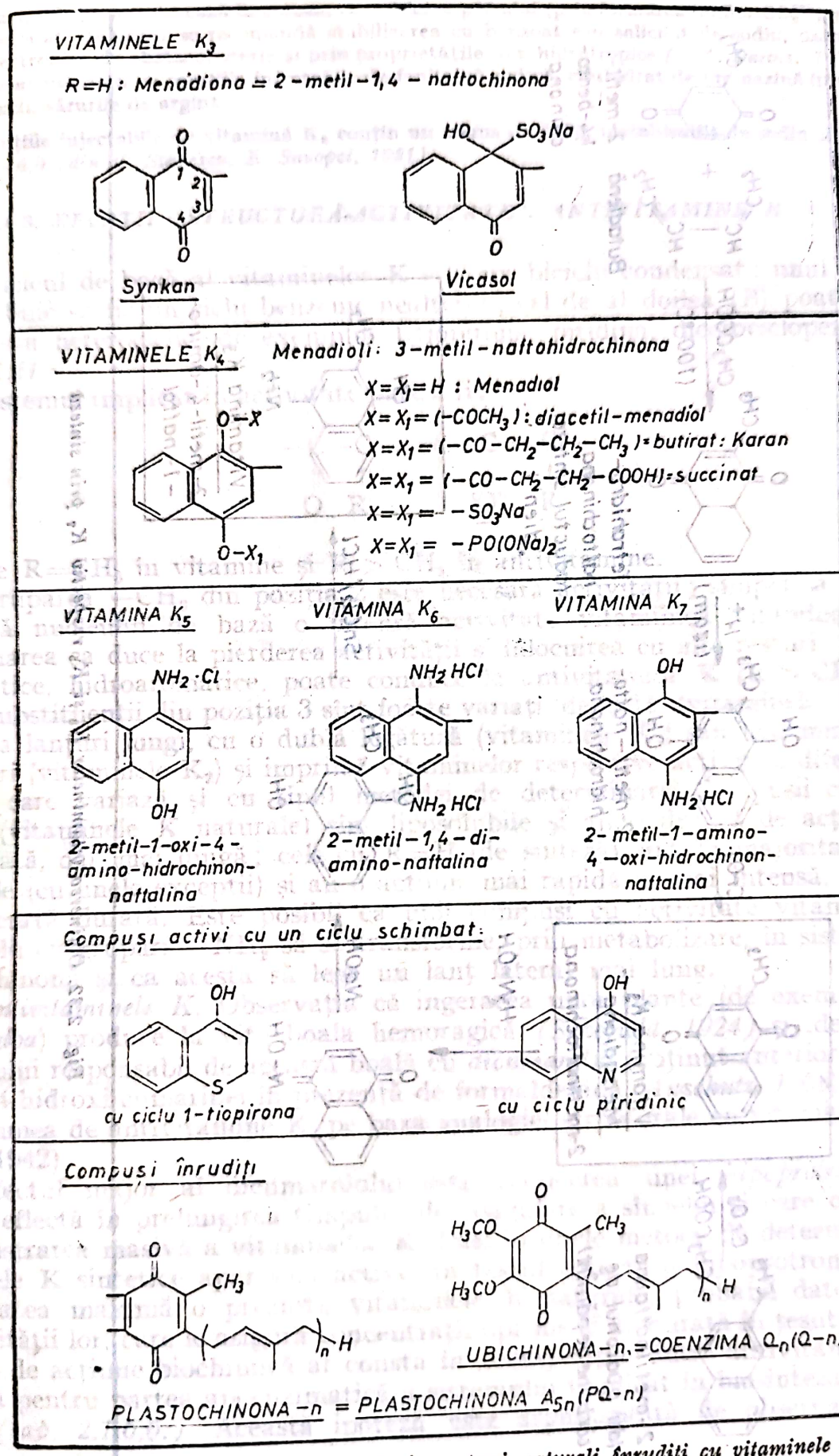


Fig. 2.31. Vitaminele K de sinteză şi compuşi naturali înruditi cu vitaminele K.

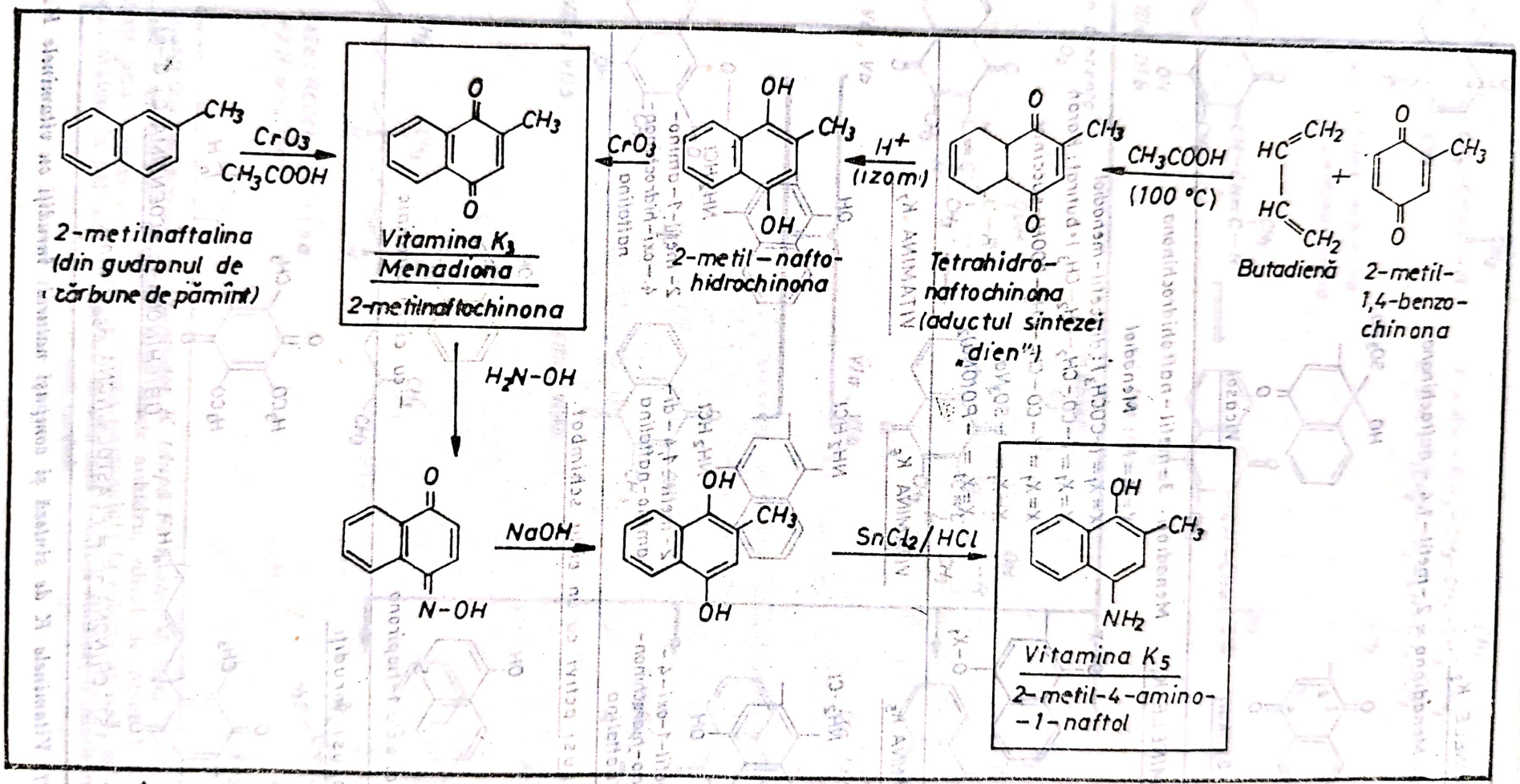


Fig. 2.32. Obținerea vitaminelor K_3 și K_5 respectiv K_1 prin sinteză

Scanned with OKEN Scanner

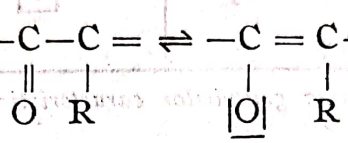
20 °C, şi într-un an şi 6 luni, la 37 °C, chiar în prezenţa metabisulfitului de sodiu (0,20%); ca urmare a hidrolizei, soluţia se colorează în galben, cu scăderea pH-ului (prin formarea ionilor SO_3^{2-}) şi apariţia unui precipitat, de aceea se recomandă stabilizarea cu benzoat sau salicilat de sodiu, datorită unor efecte electronice de obstacol steric şi prin proprietăţile lor hidrotropice *(N.A. Darbis, 1974)*. Prezintă *incompatibilităţi* cu soluţiile injectabile de fenitoină sodică, clorhidrat de promazină (precipitare), cu oxidanţii, sărurile de argint.

Soluţiile injectabile de vitamină K_3 conţin un adaus de 0,2% metabisulfit de sodiu şi au un pH de 2,0 — 4,0 *(din V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

2.1.6.3. *RELAŢII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINE K*

Nucleul de bază al vitaminelor K este un biciclu condensat: unul din cicli (A) trebuie să fie un ciclu benzenic nealterat; cel de al doilea (B) poate fi benzenic sau heterociclic, de exemplu, 1-tiopirona, piridina, dicetociclopenten etc. *(fig. 2.31)*.

Sistemul implicat în activitate pare a fi:



în care R=CH_3 în vitamine şi R > CH_3 în antivitamine.

Gruparea —CH_3 din poziţia 2 este necesară activităţii; simpla sa prezenţă conferă nucleului de bază o intensă activitate vitaminică (vitaminele K_{3-7}). Eliminarea sa duce la pierderea activităţii şi înlocuirea cu alte resturi: alifatice, aromatice, hidroaromatice, poate conduce la antivitamine K (R > CH_3).

Substituenţii din poziţia 3 sînt foarte variaţi, de la H (vitaminele K_3—K_7), pînă la lanţuri lungi, cu o dublă legătură (vitaminele K_1) sau mai multe duble legături (vitaminele K_2) şi imprimă vitaminelor respective activităţi diferite *(fig. 2.29)* care variază şi cu tipul metodei de determinare. Compuşii cu lanţuri lungi (vitaminele K naturale) sînt liposolubile şi au o durată de acţiune mai moderată, dar mai lungă; cele cu R=H (de sinteză) sînt în majoritate hidrosolubile (cu unele excepţii) şi au o acţiune mai rapidă şi mai intensă, dar de o mai scurtă durată. Este posibil ca unii compuşi cu activitate vitaminică, de exemplu cu grupări —NH_2 să se transforme, prin metabolizare, în sistemul 1,4-naftochinonă şi ca acesta să lege un lanţ lateral mai lung.

Antivitaminele K. Observaţia că ingerarea unor plante (de exemplu, *Melilotus alba*) produce la vite boala hemoragică *(Schofield, 1924)* şi identificarea factorului responsabil de această boală cu *dicumarolul* (obţinut anterior prin fierberea 4-hidroxi-cumarinei în prezenţă de formaldehidă, *Anschutz, 1908*) a condus la noţiunea de antivitamine K, pe baza analogiei structurale cu vitaminele naturale (1942).

Efectul major al dicumarolului este inducerea unei *hipoprotrombinemii* ce se reflectă în prelungirea timpului de coagulare a sîngelui şi care cedează la administrarea masivă a vitaminelor K. Deşi în unele metode de determinare, vitaminele K sintetice apar mai active, în testul corectării hipoprotrombinemiei, activitatea maximă o prezintă vitaminele K naturale, probabil datorită liposolubilităţii lor, care le asigură concentraţii optime şi de durată în ţesuturi. Mecanismul de acţiune biochimică ar consta în „competiţia" între antivitamină şi vitamină pentru partea apoenzimatică a sistemului implicat în biosinteza protrombinei *(cap. 2.1.6.6.)*. Această ipoteză este argumentată de observaţia că di-

Scanned with OKEN Scanner

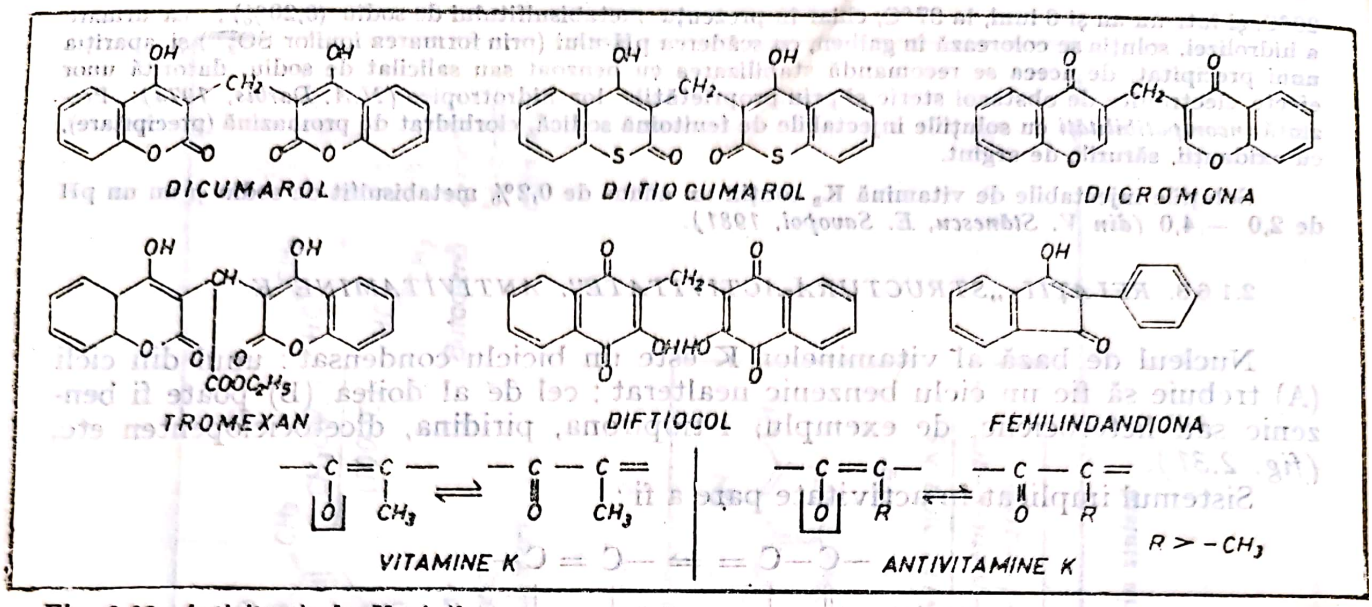


Fig. 2.33. Antivitaminele K şi ilustrarea grupărilor caracteristice din vitaminele şi antivitaminele K.

cumarolul marcat cu C radioactiv se fixează în ficat, de unde se eliberează cu timpul; administrarea unui exces de vitamină K deplasează dicumarolul şi, în consecinţă, radioactivitatea ficatului scade mult mai rapid. În general, antivitaminele K au o moleculă simetrică, deşi se cunosc şi excepţii *(fig. 2.33)*.

2.1.6.4. *METODE DE DETERMINARE. UNITĂŢI*

Avînd în vedere structura chimică variată a vitaminelor K, metodele fizice şi chimice de determinare trebuie să fie adecvate naturii şi proprietăţilor acestora: ● Absorbţia la 248 nm (pentru unele vitamine pure); ● metodele polarografice, în dependenţă de proprietăţile specifice; ● hidrogenarea catalitică a formelor chinonice, cu transformarea în hidrochinonele corespunzătoare, care, în prezenţa unui indicator de oxidoreducere (2, 6-diclorfenol-indofenol, $TiCl_3$), oferă compuşi ce pot fi determinaţi spectrofotometric; ● cu alcoolatul de Na, vitaminele K naturale dau o coloraţie purpurie; ● dozarea iodometrică pentru menadionă (F. R. VIII); ● cromatografia pe hîrtie siliconată pentru separarea vitaminelor naturale.

În *testele biologice* se determină timpul de coagulare (T.C.), nivelul protrombinemiei (T.P.) dependent de vitamina K şi/ sau efectul de contracarare a acţiunii antivitaminelor.

● Testele de coagulare urmăresc „normalizarea" timpului de coagulare (T.C.) la animalele carenţate; La puiul de găină carenţat în vitamină K, T.C. este de 60 min., faţă de valorile normale de 5 — 10 min. Testul este doar orientativ deoarece T.C. este influenţat de o serie de factori, independenţi de vitaminele K.

● Timpul de protromibă (T.P.) este mai specific decît T.C., dar şi el este dependent de o serie de factori, de exemplu, de nivelul calceniei. De aceea, se utilizează plasmă oxalatată (pentru îndepărtarea Ca^{2+}) 0,1 ml, la care se adaugă trombokinază (0,1 ml), se încălzeşte la 37,5° şi apoi se adaugă o cantitate cunoscută de $CaCl_2$ (0,1 ml sol. 0,02 M). T.P. normal este în jur de 14 sec (100%) la om *(R. J. Quick, 1938)*.

● Urmărirea T.C. sau T.P. la animalele la care s-a produs avitaminoza K prin antivitamine K (mult mai specifice).

În interpretarea rezultatelor este necesar să se ţină seama de specia animalului, de vîrstă, de condiţiile de lucru (evitarea coprofagiei, sursă de vitamină K) etc.

Unitatea Dam reprezintă cantitatea de vitamină K/kg greut. corp. care normalizează în 3 zile T.C. al puiului de găină carenţat în vitamină K. 1.U.Dam = 0,083 μg vit.K_1 = 0,14 μg vit. K_2 = = 0,004 μg vit. K_3.

Unitatea „standard" = 1 μg vitamina K_3 (menadiona); în testul indicat pentru această unitate, vitamina K_3 de sinteză este de 3 ori mai activă decît vitamina K_1 şi de 6 ori decît vitamina K_2.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.6.5. *METABOLISMUL VITAMINELOR K*

Vitamina K_1 este răspîndită în special în plantele verzi; frunzele expuse la lumină sînt mai bogate decît cele din umbră; florile și fructele sînt sărace în vitamină K. Deși vitamina K_1 conține în molecula sa restul fitil, prezent și în clorofilă, totuși între acestea nu se înregistrează corelații cantitative.

Sursa majoră a vitaminelor K_2 sînt microorganismele; flora intestinală normală produce cantități apreciabile de vitamine K, suficiente pentru a asigura necesitățile organismului uman. Cercetările pe medii artificiale arată că diferitele microorganisme produc forme variate ale vitaminelor K_2, de exemplu, $K_{2(35)}$: *Bac. subtilis, Bac. megatherium, Staphylococcus albus* (Gram +); $K_{2(40)}$: *Sarcina lutea* (Gram +), *Escherichia coli, Proteus vulgaris* (Gram —); $K_{2(45)}$: *Corynebacterium diphtericum;* $K_{2(50)}$: *Mycobacterium tuberculosis* (J. Fragner, 1965). Principalii producători sînt *B. subtilis* (190 U.I./g), *B. mycoides (155), B. cereus (115), Sarcina lutea (100), B. proteus* (75), *E. coli* (15 U.I.), dar aportul real depinde de proporția lor din flora intestinală.

Biogeneza vitaminelor K la plante și microorganisme implică formarea lanțului lateral, după principiul biosintezei poliizoprenilor, pînă la geranil-geranil-P—P *(fig. 2.6A)* și, separat, a 2-metil-hidronaftochinonei, urmate de legarea lor *(fig. 2.34)*.

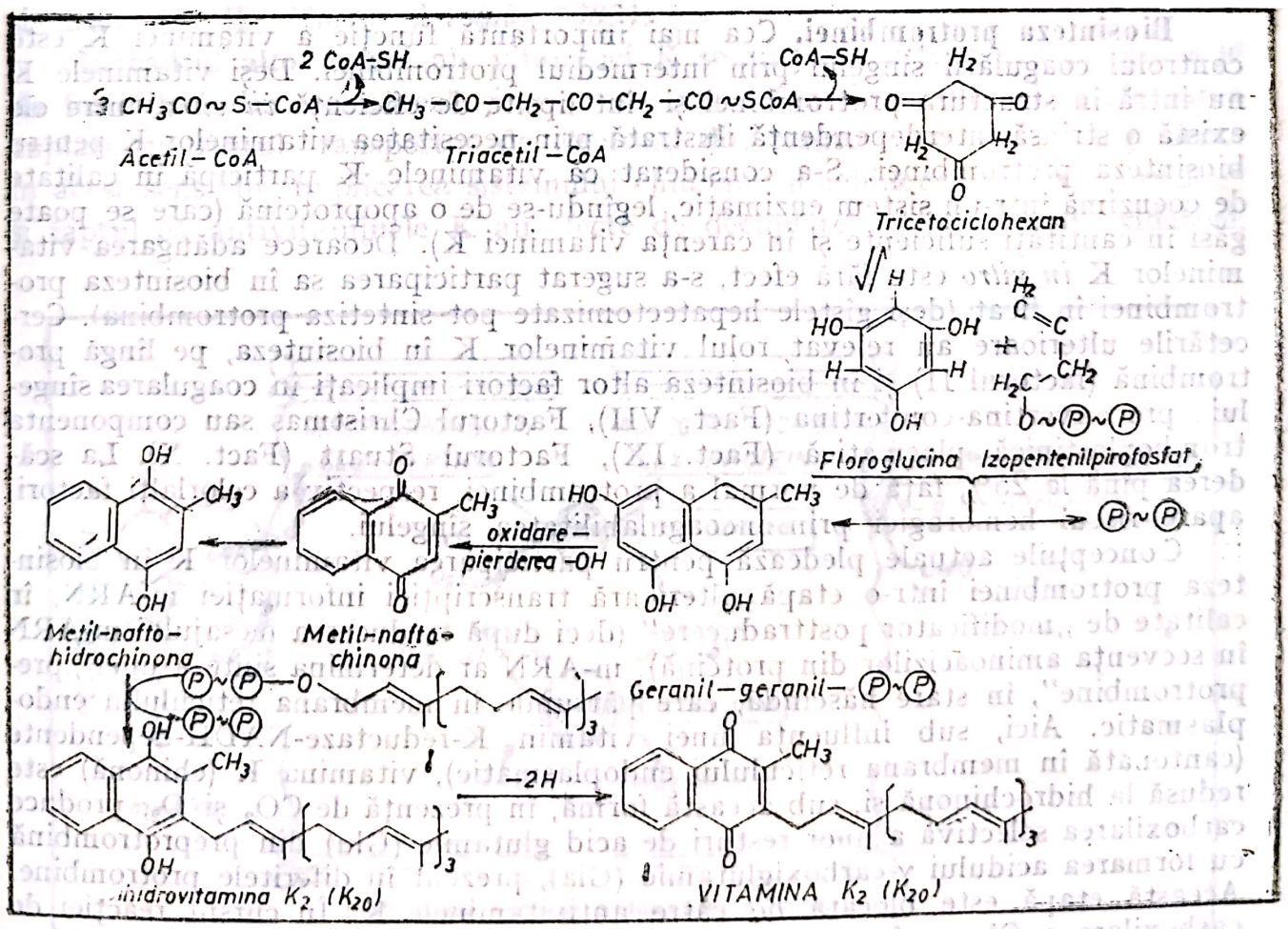


Fig. 2.34. Biosinteza vitaminei K_2

Absorbția și repartizarea sînt diferite în cazul vitaminelor K naturale (liposolubile) și sintetice (hidrosolubile). Vitaminele K naturale, după resorbție (în special din jejun), datorită liposolubilității lor, apar, împreună cu lipidele, inițial în vasele limfatice și apoi, în cantități constante în sînge. După injectarea *i.v.* a vitaminei K_1 marcate (în dispersie apoasă), 70% se depozitează în ficat și splină și numai 1% în rinichi și plămîni; după inj. *i.m.*, nu se constată depozite în organe. Vitamina K_3 sintetică (menadiona) nu se acumulează în ficat și excesul se elimină ca *glucurono-* sau sulfoconjugați (la fel cu fenolii). O parte din menadiona marcată se regăsește sub forma vitaminei $K_{2(20)}$, ceea ce sugerează posibilitatea legării în organism a unui lanț lateral, în cazul de față geranil-geranil, pe nucleul 2-metil-naftochinonei.

Ficatul prezintă o mare importanță pentru vitaminele K, sub aspecte multiple: ca loc de depozitare, în dependență de natura lor (cantități mai mari de vitamine liposolubile și minime de vitamine hidrosolubile); prin producția bilei, necesară absorbției din intestin și ca sediu al formării protrombinei *(cap. 2.1.6.6)*. Plămînul intervine în catabolismul (distrugerea) protrombinei plasmatice, ilustrat prin hipoprotrombinemia din primele zile ale pneumoniei. Deoarece capacitatea de depozitare este mică și metabolizarea foarte rapidă, simptomele caracteristice apar chiar după 24—48 ore de la carențare.

2.1.6.6. *ROLUL BIOCHIMIC AL VITAMINELOR K*

Biosinteza protrombinei. Cea mai importantă funcție a vitaminei K este controlul coagulării sîngelui prin intermediul protrombinei. Deși vitaminele K nu intră în structura protrombinei și sînt lipsite de eficiență *in vitro*, între ele există o strînsă interdependență ilustrată prin necesitatea vitaminelor K pentru biosinteza protrombinei. S-a considerat că vitaminele K participă în calitate de coenzimă într-un sistem enzimatic, legîndu-se de o apoproteină (care se poate găsi în cantități suficiente și în carența vitaminei K). Deoarece adăugarea vitaminelor K *in vitro* este fără efect, s-a sugerat participarea sa în biosinteza protrombinei în ficat (deși gîștele hepatectomizate pot sintetiza protrombina). Cercetările ulterioare au relevat rolul vitaminelor K în biosinteza, pe lîngă protrombină (factorul II) și în biosinteza altor factori implicați în coagularea sîngelui: proconvertina-convertina (Fact. VII), Factorul Christmas sau componenta tromboplastinică plasmatică (Fact. IX), Factorul Stuart (Fact. X). La scăderea pînă la 25% față de normal a protrombinei, respectiv a celorlalți factori, apare riscul hemoragiei prin incoagulabilitatea sîngelui.

Concepțiile actuale pledează pentru participarea vitaminelor K în biosinteza protrombinei într-o etapă ulterioară transcripției informației m-ARN, în calitate de „modificator posttraducere" (deci după traducerea mesajului m-ARN în secvența aminoacizilor din proteină). m-ARN ar determina sinteza unei „preprotrombine", în stare născîndă, care pătrunde în membrana reticulului endoplasmatic. Aici, sub influența unei vitamin K-reductaze-NADH-dependente (cantonată în membrana reticulului endoplasmatic), vitamina K (chinonă) este redusă la hidrochinonă și, sub această formă, în prezență de CO_2 și O_2, produce carboxilarea selectivă a unor resturi de acid glutamic (Glu) din preprotrombină cu formarea acidului γ-carboxiglutamic (Gla), prezent în diferitele protrombine. Această etapă este blocată de către antivitaminele K. În cursul reacției de carboxilare a Glu se formează vitamina K-chinonă, care este redusă la hidro-

Scanned with OKEN Scanner

chinona corespunzătoare (pentru a participa într-un nou ciclu), în timp ce agli-coprotrombina carboxilată leagă resturi glicozidice și sialice, sub influența glucoziltransferazei, formînd astfel molecula protrombinei definitive, care trece în plasmă *(fig. 2.35) (R. E. Olson, J. W. Suttie, 1977, 1978)*.

Sistemul carboxilazei vitamin-K-dependente a fost descris inițial ca fiind prezent în microzomii hepatici *(C. T. Esmond, 1975)* și apoi în os, rinichi, splină, placentă. Resturile de Gla din protrombină funcționează ca locuri de legare ale Ca^{2+} și astfel asigură transportul mediat al Ca^{2+} la suprafața membranelor fosfolipidice (micele) și stimulează activarea proteolitică *in vivo*. Interacțiunea mutuală dintre Ca^{2+} și compușii organici ai matricei (proteine, proteoglicani, fosfolipide) din os și alte țesuturi mineralizate este strîns dependentă de organizarea și integritatea acestor țesuturi; prezența la acest nivel a sistemului de carboxilare a protrombinei vitamin-K-depedent sugerează că proteinele care conțin Gla sînt implicate în reglarea depozitării sărurilor de calciu, în polimorfismul cristalografic al fazei minerale și în *turnoverul* mineralelor osului. Asemenea proteine, a căror sinteză este vitamin-K-dependentă sînt *osteocalcina*, izolată din oasele puilor de găină, alcătuită din 57 resturi de aminoacizi, dintre care patru sînt Gla *(P. V. Hauschka, J. B. Lian, P. M. Gallop, 1975, 1978)*, precum și cele din rinichi și respectiv din matricea organică a calculilor din rinichi și urină *(D. W. Martin și colab., 1983)*.

În cadrul **altor roluri** ale vitaminei K se susține participarea în procesele de fosforilare din fotosinteză și se presupune o funcție similară în fosforilarea cuplată cu lanțul transportor de electroni din țesuturile animale. Argumente în acest sens sînt implicarea sistemului chinonic (ubichinona) în transportul e^- și faptul că antivitaminele K au efecte de decuplare ale fosforilării oxidative.

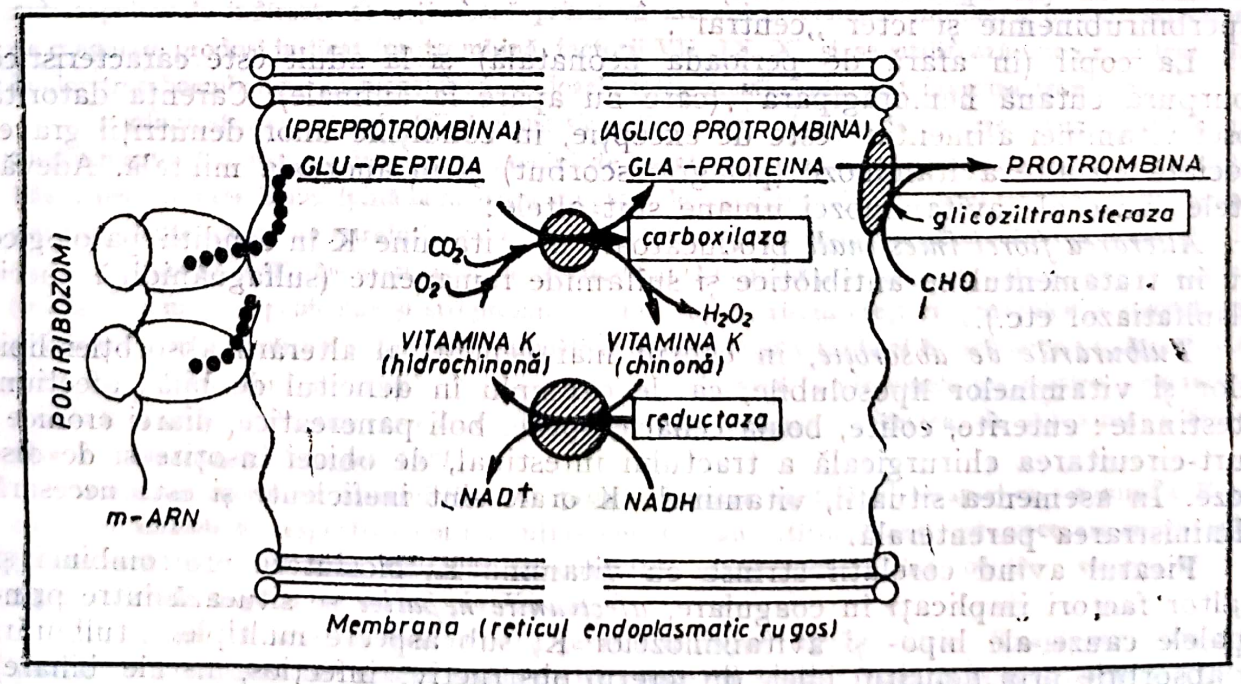


Fig. 2.35. Rolul vitaminelor K în biosinteza protrombinei (după H. A. Harper și colab., 1979)

2.1.6.7. *AVITAMINOZA K. NECESITĂȚI*

Carența în vitamină K se manifestă prin scăderea protrombinemiei, cu prelungirea timpului de coagulare al sîngelui, ce duce la *sindromul hemoragipar*, caracterizat prin hemoragii spontane: peritoneale, hepatice, subcutane, intravasculare. Deoarece „viața biologică" (T1/2) a protrombinei este foarte scurtă, de numai cîteva ore, este necesară biosinteza sa continuă și, deci, un aport permanent de vitamină K, asigurat, în condiții normale, prin alimentație și/sau prin producția florei intestinale care poate, singură, acoperi necesitățile de aproximativ 2 mg/zi. În depletiția umană, o doză de 0,03 mg vitamină K i.v./kg greut. corp normalizează T.C. și T.P. la persoanele deficiente în vitamină K *(P.G. Frick și colab., 1967)*.

Noul născut prezintă o predispoziție specială la avitaminoza K deoarece se naște fără rezerve (trecerea transplacentară a vitaminei K este foarte redusă) și, pe de altă parte, intestinul său este steril și deci lipsit de flora producătoare de vitamină K. Laptele matern conține puțină vitamină K și nu poate compensa deficitul din viața intrauterină iar popularea cu flora intestinală generatoare de vitamină K necesită un timp de 4—10 zile (mai lung la cei alăptați de mamă). Ca o consecință a deficitului de vitamină K, nivelul protrombinemiei din primele zile de viață este de numai 10—40% față de valorile ulterioare și din această cauză 1 din 150 noi născuți manifestă semnele diatezei hemoragice, cu sîngerări la nivelul cordonului ombilical, tegumentelor, nasului, retinei, creierului (meningeale), tractului gastrointestinal, suprarenalelor și constituie astfel una din cauzele principale ale mortalității neonatale, cu atît mai gravă cu cît mama este mai carențată în vitamină K. Pentru prevenirea carenței se poate administra vitamină K_3 mamei (2—5 mg/zi) sau noului născut (1 mg/zi), dar este preferabilă alimentarea mamei cu legume-foi cu 7—10 zile înainte de naștere. La prematuri (aproape complet lipsiți de vitamină K) și la noi născuți, excesul de vitamine K (în special sintetice) crește incidența fenomenelor hemolitice, cu hiperbilirubinemie și icter „central".

La copil (în afară de perioada neonatală) și la adult este caracteristică „purpura cutană hemoragipară" (care nu apare la animale). Carența datorită lipsei vitaminei alimentare este de excepție, în condițiile unor denutriții grave, asociată cu alte avitaminoze (pelagră, scorbut) și în anorexia mintală. Adevăratele cauze ale avitaminozei umane sînt altele:

Alterarea florei intestinale producătoare de vitamine K în condiții patologice sau în tratamentul cu antibiotice și sulfamide remanente (sulfaguanidină, succinilsulfatiazol etc.).

Tulburările de absorbție, în cadrul mai general al alterării absorbției lipidelor și vitaminelor liposolubile, ca de exemplu în deficitul de bilă; afecțiuni intestinale: enterite, colite, boala celiacă, sprue, boli pancreatice, diarei cronice; scurt-circuitarea chirurgicală a tractului intestinal, de obicei însoțite și de disbioze. În asemenea situații, vitaminele K orale sînt ineficiente și este necesară administrarea parenterală.

Ficatul avînd corelații strînse cu vitamina K, biosinteza protrombinei și a altor factori implicați în coagulare, *afecțiunile hepatice* se situează între principalele cauze ale hipo- și avitaminozelor K, sub aspecte multiple: tulburări de absorbție prin deficitul bilei, (în icterul obstructiv, infecțios, fistule biliare) leziuni ale parenchimului hepatic, cu scăderea potențialului funcțional și res-

pectiv al biosintezei factorilor coagulării (în hepatitele toxice prin cloroform, (în anestezie), galben de unt, arsenoterapie; hepatite virotice, ciroze atrofice etc.); interferarea (blocarea) biosintezei protrombinei prin antivitaminele K (dicumarol, diftiocol etc.). Terapia cu salicilaţi, acid acetilsalicilic (aspirină), acid para-amino-salicilic (PAS) este adesea însoţită de hipoprotrombinemie şi hemoragii gastrointestinale;

În *boli infecţioase:* pneumonie, TBC pulmonară evolutivă şi extrapulmonară; în stările febrile prelungite şi respectiv în terapia de durată a acestora cu medicamente, care adesea, determină avitaminoze K secundare;

În *hipoprotrombinemia idiopatică congenitală* şi *familială* şi respectiv în *deficitul genetic* al unor factori de coagulare.

2.1.6.8. *INDICAŢII. TOXICITATE*

Indicaţiile majore ale preparatelor de vitamină K sînt în controlul (normalizarea) timpului de coagulare prin deficit de protrombină, de exemplu, în pregătirea preoperatorie, chirurgia hepatică, bol hepatice (în special ciroze); în obstetrică, prin administrarea profilactică la gravidă înainte de naştere (de preferat vitamina K_1, care nu produce alterări ale sîngelui, cu hemoliză şi icter, ce pot apare după vitaminele K_3, K_4); la prematuri şi nou-născuţii cu carenţă de vitamine K; în prevenirea tulburărilor de coagulare din cursul medicaţiei care afectează, sub o formă oarecare, vitaminele K şi respectiv protrombina. Este de menţionat că flebitele şi stările tromboembolice sînt contraindicaţii majore ale terapiei cu vitamine K şi alţi agenţi coagulanţi.

Vitaminele K_3, K_4, K_5 au efecte fungistatice şi fungicide, cu utilizări în dermatologie şi în industrie, de exemplu, pentru conservarea alimentelor (siropuri, sucuri, vinuri, bere etc.).

Vitamina K serveşte ca *„substanţă de diagnostic"* în afecţiunile hepatice; normalizarea protrombinemiei după administrarea a 30—50 mg vitamine K hidrosolubile în timp de 4 zile, indică o carenţă de aport sau de absorbţie (de exemplu, icter obstructiv), iar lipsa de răspuns, o afectare a parenchimului hepatic.

Antivitaminele K, în special derivaţii de cumarină şi indandionă *(cap. 2.1.6.3)* fac parte din anticoagulantele indirecte ce acţionează printr-un mecanism comun: inhibarea biosintezei factorilor de coagulare produşi în ficat (protrombină, factorii VII, IX, X) şi se utilizează, major, în tratamentul bolilor tromboembolice, cu menţiunea că dozele mici, insuficiente, pot favoriza tromboza.

În administrarea vitaminei K trebuie să se ţină seama de a serie de interacţiuni posibile cu alte medicamente. Laxativele, de exemplu, uleiul de parafină, diminuează absorbţia vitaminelor liposolubile la nivelul intestinului (pînă la apariţia simptomelor de carenţă); în cazul terapiei cu medicamente anticoagulante, uleiul de parafină potenţează efectul lor anticoagulant, prin scăderea absorbţiei intestinale a vitaminelor K. De asemenea, în asocierea anticoagulanţilor orali cu antibioticele: kanamicină (orală), neomicină, peniciline şi streptomicine orale, apare riscul creşterii puternice a efectului hipocoagulant prin mecanisme conjugate: împiedicarea resorbţiei vitaminei K, scăderea producerii vitaminelor K de către flora intestinală, prin competiţia în legarea la proteinele plasmatice, deoarece vitaminele K şi anticoagulantele orale au o afinitate similară de legare la acestea, de aproximativ 80—90% *(din V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Reglarea coagulării sîngelui fiind un proces complex, în timpul terapiei cu vitaminele K şi/sau cu antivitaminele K, respectiv cu alţi agenţi coagulanţi sau anticoagulanţi, este necesară supravegherea permanentă (monitorizarea) timpului de coagulare şi de protrombină, pentru evitarea hipo- sau hipercoagulării sîngelui, la fel de periculoase.

Toxicitate. În afară de posibilitatea producerii hipercoagulabilităţii (în aplicaţii terapeutice), vitaminele K naturale sînt practic lipsite de toxicitate; în schimb, vitaminele K sintetice pot produce simptome de intoxicare (depresia respiraţiei, cianoză, convulsii, vărsături, anemie etc).

Scanned with OKEN Scanner

2.1.II. VITAMINELE HIDROSOLUBILE

2.1.II.1. VITAMINELE DIN GRUPUL B

Vitaminele din grupul B pot fi clasificate, după acţiunile lor, în *vitamina B_1 şi B_2; vitamine dermotrope sau antipelagroase: PP* (pentru om), B_6 (pentru şobolan), *acidul pantotenic* (pentru păsări); *factori „Bios" sau de creştere a microorganismelor: biotina, PAB; antianemice, hematoformatoare: acizii folici şi folinici, vitaminele B_{12} (corrinoide)*. Ele se caracterizează prin rolul lor de COENZIME, implicate în procese biochimice de mare importanţă *(Tabelul 2.5)*.

TABELUL 2.5

Vitamine cu rol de coenzime

Grup	*Vitamina*	*Coenzima*	*Enzima şi/sau reacţiile catalizate*
B	TIAMINA (B_1)	TPP	Complexul piruvat-dehidrogenază; piruvat-decarboxilază (drojdie); complexul α-cetoglutarat-dehidrogenază; transcetolaze
	RIBOFLAVINA	FMN, FAD	Transferul de H sau e^-. *Oxidaze:* L-aminoacidoxidaze; aldehidoxidaze; xantinoxidaza, D-aminoacidoxidaze *Dehidrogenaze:* NAD(P)H_2-dehidrogenaze; Acil-CoA-dehidrogenaze; succindehidrogenaza; glutamatreductaza
	PIRIDOXINA (B_6)	PALPO	Sinteza grupărilor $-NH_2$; decarboxilări. *Aminoacid-decarboxilaze* ale Tir, His, Trp, 5-hidroxi-Trp, Glu etc. *Transaminaze:* GOT, GPT etc. *Deshidrataze* ale Ser, Tre, homo-Ser *Desulfhidraze* ale Cis, homo-Cis *Scindarea aminoacizilor* Tre-, Ser-aldolaze
	NICOTINAMIDA (PP)	NAD, NADP	În transportul H sau e^-. Oxidoreductaze, epimeraze, hidroxilaze
	BIOTINA	BIOCITINA	Transferul grupărilor „C_1" Acetil-CoA-carboxilaza; β-metil-crotonil-CoA-carboxilaza; propionil-CoA-carboxilaza; metil-malonil-CoA-carboxilaza; piruvat-carboxilaza
	PANTOTENAT	CoA	În activarea şi transferul grupărilor acil; în metabolismul acidului piruvic etc.
	LIPOAT		În transferul grupărilor acil
	ACIZI FOLINICI	FH_4	În formarea şi transferul grupărilor „C_1": metil, formil, metilen
	COBALAMINA (B_{12})	Deoxiadenozil-cobalamine	În formarea şi transferul grupărilor alchil. Metil-aspartat-mutaza; metil-malonil-CoA-mutaza; dioldehidraze; metioninsintetaza; metansintetaza; ribonucleotidreductaze
A	VITAMINA A	Retinal-opsine	În pigmenţii vizuali
K	FILOCHINONE	Coenzima Q	În transferul H^+ şi e^-

2.1.7. TIAMINA. VITAMINA B_1. VITAMINA ANTI-BERI-BERI. VITAMINA ANTINEURITICĂ. ANEURINA.

Bolile legate de carența vitaminei B_1 au fost descrise anterior descoperirii vitaminelor (cap. 2.1.1.2) sub denumirea de *„beri-beri"* (*J. de Bondt: „De medicina Indorum"*, 1642; *J. G. Malcolmson, 1835*), cu recomandarea suplimentării hranei marinarilor japonezi (bogată în orez), cu carne (*T. Takaki, 1882*), și respectiv „boala muncitorilor din fabricile de zahăr" (Brazilia).

Producerea experimentală, prin alimentare cu orez decorticat, a „polinevritei aviare" la găini și porumbei (*C. Eijkman, 1897; G. Grijns, 1901*) și a polinevritei umane la bolnavii din azilele de alienați (*W. Flechtner, 1907*) și respectiv prevenirea simptomelor carențiale prin adăugarea tărîțelor de orez, au condus la obținerea din cojile de orez a „orizaminei" (*G. Grijns, 1901; Suzuki, Shamimuva, Odake, 1912*) și, la scurt timp, a „primei vitamine" (*K. Funk, 1914*) (în realitate un amestec de mai multe vitamine din grupul B, între care predominau vitaminele P.P. și B_1) și care a fost definit ca o vitamină hidrosolubilă (*Mc. Collum, Kennedy, 1916*). Ulterior, s-a izolat *aneurina* în stare pură (*B. C. Jansen, W. F. Donath, 1926*), s-a stabilit structura (*A. Windaus și colab.; R. R. Williams; A. T. Clarke și colab., 1931—1935*), s-a obținut prin sinteză (*R. R. Williams, 1934—1935; H. Andersang, 1936*) și s-a relevat rolul său enzimatic în metabolismul glucidelor (*R. A. Peters*, din 1929 și în continuare) și în activitatea colinesterazei din țesutul nervos (*Beatrice Mintz, E. Abderhalden, 1938*).

2.1.7.1. *STRUCTURA VITAMINEI B_1. PREPARARE*

Tiamina este alcătuită dintr-un nucleu pirimidinic și unul tiazolic (ambii substituiți) legați între ei printr-o punte $—CH_2—$ și are următoarea structură: 3-(4'-amino-2'-metil-pirimidil)-5'-ilmetil-5-(2-hidroxietil)-4-metil-tiazol, respectiv sub formă de clor-clorhidrat (sau brom-bromhidrat). F.R. IX prevede „clorhidrat de clorură de 3-(4-amino-2-metil-pirimidil-5-metil)-5-(β-hidroxietil)-4-metiltiazol" (*fig. 2.36*).

Prin esterificare la nivelul grupării —OH cu un rest de acid fosforic se obține tiaminmonofosfatul sau TMP; cu două resturi de acid fosforic: tiamindifosfatul (tiaminpirofosfat), TPP sau TDP (cu p.t. 242—244°C), care constituie partea activă enzimatic, *cocarboxilaza*; cu trei resturi de acid fosforic se formează tiamintrifosfatul sau TTP (*fig. 2.36*)

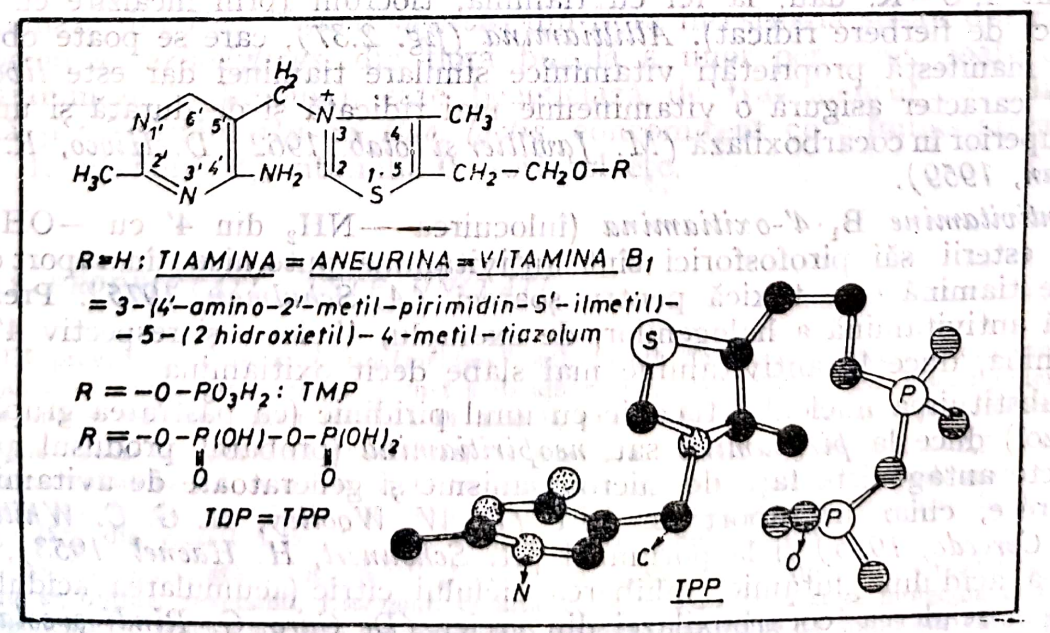


Fig. 2.36. Structura vitaminei B_1 și a derivaților săi coenzimatici

Prepararea (izolarea) din sursele naturale (coji de orez, drojdie) comportă: extragerea cu apă, adsorbția (de exemplu, pe caolină), eluția (cu soluție de chinină sau piridină), benzoilarea și eliminarea impurităților (cu cloroform,), precipitarea (cu $AgNO_3$-barită și apoi cu acid fosfotungstic; cu acid picrolonic sau $AuCl_3$) și recristalizarea din alcooli (etilic, butilic) și fenol.

Metodele extractive servesc în prezent doar pentru obținerea „concentratelor de vitamine B"; vitamina B_1 farmaceutică se obține, aproape în exclusivitate, prin sinteză chimică.

2.1.7.2. *RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINELE* B_1

Molecula tiaminei prezintă interesante relații „structură-activitate".

La nivelul nucleului pirimidinic, înlocuirea $-CH_3$ din 2′ cu $-C_2H_5$ oferă un analog de două ori mai activ, dar înlocuirea cu butil duce la un antagonist; prezența $-NH_2$ din 4′ este obligatorie, înlocuirea sa conducînd la antivitamine.

Puntea $-CH_2-$ este necesară activității; prin înlocuire cu $-CH_2-CH_2-$ activitatea scade la 1/10.

În partea tiazolică, R din 4 trebuie să fie un alchil scurt; cel mai activ este metilul; etilul și propilul dau activități mai slabe (50%) iar lanțurile $> C_3$ determină pierderea activității vitaminice. Poziția 5 necesită un lanț cu o grupare —OH, capabilă să esterifice acidul fosforic pentru a forma coenzimele active; cel mai eficient este radicalul alcoolului etilic; cel propilic are o activitate mai mică. C_2 trebuie să fie liber (să posede H); legarea $-CH_3$ sau $-C_2H_5$ sting activitatea, cu excepția introducerii sulfului, care conduce la sulftiamină activă (posibil ca aceasta să se metabolizeze în organism la vitamina B_1). Înlocuirea S tiazolic cu O duce la pierderea activității *(J. F. Codington, M. H. Wuest, 1957)*. N din tiazol este pentavalent: în produsele farmaceutice leagă Cl^- sau Br^-.

Între *analogii activi (fig. 2.37)*, cel puțin pentru unele specii, se menționează unii compuși cu structură mult mai simplă, ca de exemplu: 3-oxietil-piridina și 2-metil-3-oxietil-piridina *(Baumgarten,* 1940).

Compușii cu ciclul tiazolic scindat la nivelul S și care au, în plus, un fragment —S—R, dau, la fel cu tiamina, tiocrom (prin încălzire cu solvenți cu punct de fierbere ridicat). *Alliltiamina (fig. 2.37)*, care se poate obține din alliină, manifestă proprietăți vitaminice similare tiaminei dar este *liposolubilă* și acest caracter asigură o vitaminemie mai ridicată și de durată și un randament superior în cocarboxilază *(M. Javillier și colab., 1962; D. Hioco, R. Tixier, A. Uzan, 1959)*.

Antivitamine B_1 *· 4′-oxitiamina* (înlocuirea $-NH_2$ din 4′ cu —OH) și respectiv esterii săi pirofosforici sînt antivitamine puternice; în raport de 25 : 1 față de tiamină este toxică pentru șoareci *(A. Schulman, 1975)*. Prezența în această antivitamină a halogenilor, de exemplu, 4′-cloro- și respectiv 4′-bromo-oxitiamina, duce la antivitamine mai slabe decît oxitiamina.

Substituirea nucleului tiazolic cu unul piridinic (cu păstrarea grupărilor de pe tiazol) duce la *piritiamină* sau *neopiritiamină* (probabil produsul purificat) cu efecte antagoniste față de microorganisme și generatoare de avitaminoză B_1 la șoarece, chiar în raport de 1 : 1 *(D. W. Woolley, A. G. C. White, 1943; L. R. Cercedo, 1955)* și la porumbel *(A. Scheunert, H. Haenel, 1953)*, cu acumularea acidului glutamic, inhibarea ciclului citric (acumularea acidului oxal-acetic) și scăderea cocarboxilazei din creier *(De Caro, G. Rindi și colab., 1954, 1956, 1958)*. *Sulfatiazolul* manifestă, de asemenea, efecte de antivitamină B_1.

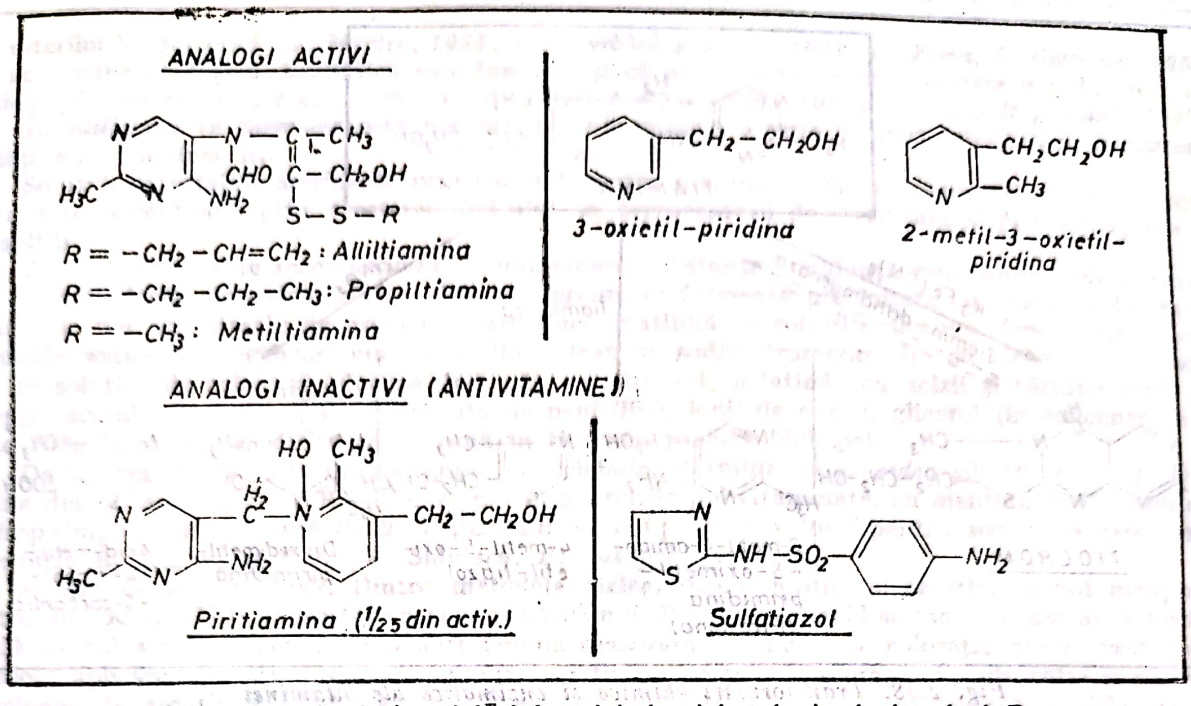


Fig. 2.37. Analogi activi și inactivi (antivitamine) ai vitaminei B_1

Enzime tiaminolitice. Avitaminoze B_1 experimentale (pure) sau accidentale se pot produce prin *tiaminază,* enzimă care distruge molecula vitaminei B_1 *(fig. 2.38).* Descoperirea acestei enzime este legată de observația că vulpile (argintii) hrănite cu carne de pește crud (crap) manifestă o paralizie, denumită „paralizia Chastek", care cedează la administrarea vitaminei B_1. Enzima este abundentă în mușchiul (carnea) peștilor, dar se găsește și în inima și splina iepurilor și găinilor; prin fierberea acestor produse enzima se inactivează și, în consecință, nu mai manifestă efectele antivitaminice *(R. G. Green și colab., 1941; G. H. Spitzer, A. J. Combes, C. A. Elvehjem, 1941; L. O. Krampitz, D. W. Woolley, 1944).*

Tiaminaza din *Bac. thyaminolyticus* din flora intestinală și/sau din ciuperca *Trichosporon aneurinolyticus,* din flora bucală a unor persoane, poate duce la boala „tiaminazei" (Japonia), care beneficiază de tratamentul cu sulfamide, penicilină și reînsămînțarea cu *Bac. lactis,* concomitent cu administrarea suplimentară de vitamină B_1, vitamină C, sorbitol etc.

2.1.7.3. *PROPRIETĂȚI. TESTE. UNITĂȚI*

F.R.IX prevede „*Thiamini hydrochloridum*" sub formă de cristale mici incolore sau pulbere cristalină albă, cu miros caracteristic și gust slab amar; p.t. 246–252°C (cu descompunere); ușor solubilă în apă și glicerină, greu solubilă în alcooli, practic insolubilă în eter și cloroform.

Soluțiile apoase au pH acid (clorhidrat) de exemplu, soluția 2% are pH = 2,7 — 4,3; solubilitatea este minimă la pH = 3,5 și crește cu acidifierea și, în special, prin alcalinizare. Vitamina B_1 este termostabilă, dar această stabilitate este condiționată de pH: prin încălzire la 97°C/1 oră se distruge 25% din vitamină la pH = 3; 30% la pH 7 și 80% la pH = 10.

Prin oxidare menajată cu $K_3[Fe(CN)_6]$ în mediu alcalin, cu $KMnO_4$ sau cu enzima *tiaminde hidrogenază* se obține, reversibil, *tiocromul.* O altă enzimă, *tiaminaza* rupe molecula în cele două părți componente; o reacție similară are loc și sub acțiunea sulfitului de sodiu (în care apare gruparea $-CH_2-SO_3H$ în loc de $-CH_2OH$). Oxidarea mai puternică, de exemplu cu HNO_3, duce

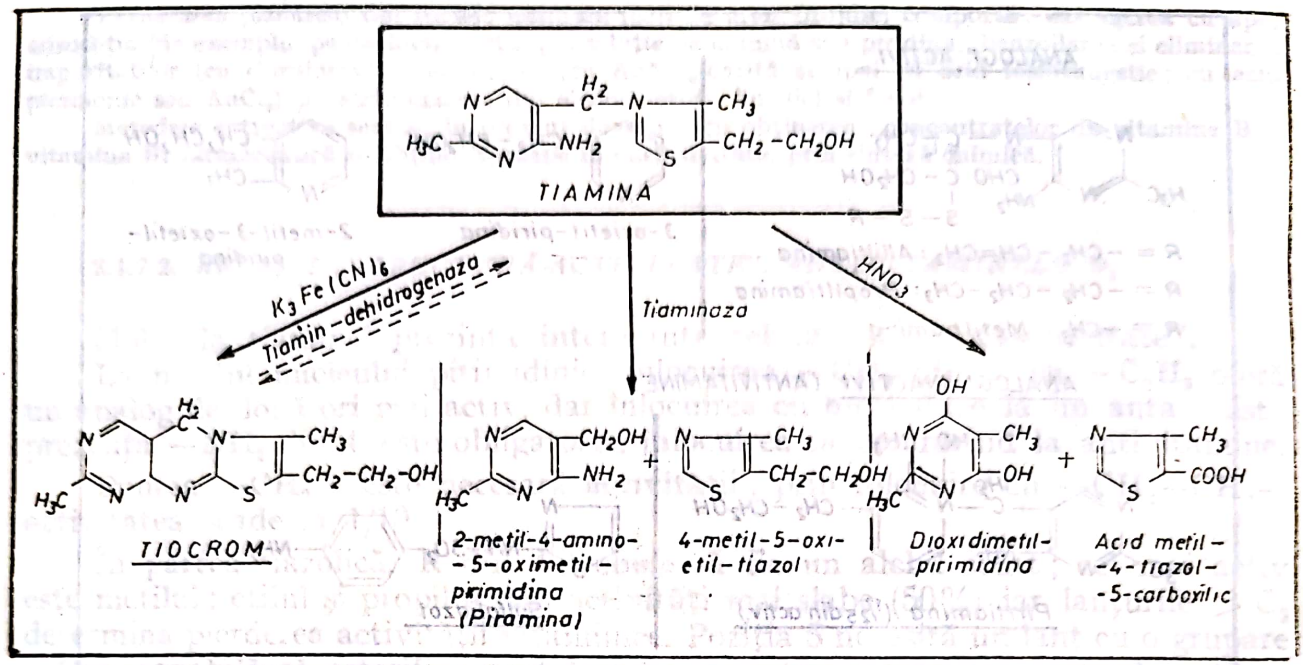


Fig. 2.38. Transformări chimice și enzimatice ale vitaminei B_1

la produși de degradare mai avansați, cu mențiunea că reacțiile însoțite de scindarea moleculei sînt ireversibile și distrug activitatea vitaminei *(fig. 2.38)*.

În mediu alcalin, în aer sau în prezență de I_2, H_2O_2, tiamina se transformă într-o formă disulfidică (oxidată), care se reduce în prezența H_2/Sn sau cu compușii tiolici (cisteină, glutation redus) la tiamină și/sau la un compus tiolic *(fig. 2.39)* considerîndu-se că forma tiolică și disulfidică ar putea constitui un sistem redox biologic *(H. T. Clarke, S. Gurin, 1935; O. Zima și colab., 1940—1941)*. La plante și animale se înregistrează un echilibru între formele reduse și oxidate ale tiaminei

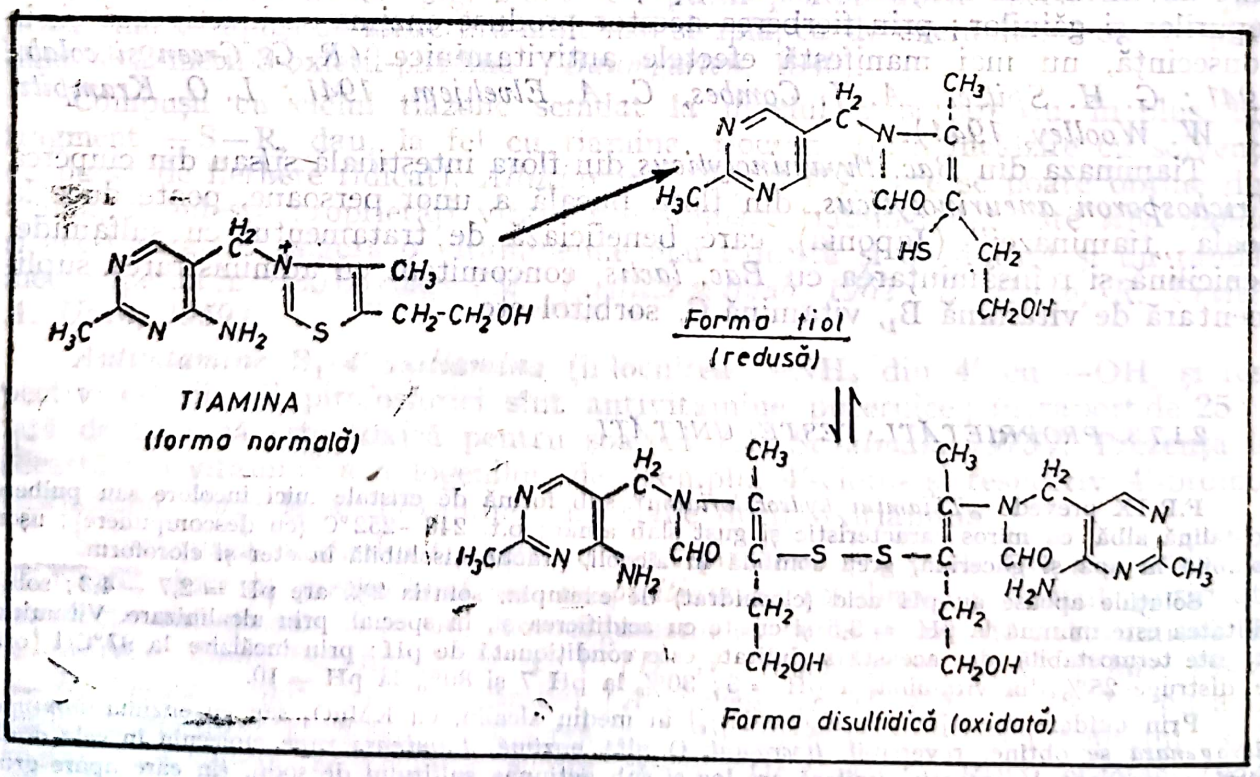


Fig. 2.39. Forme de oxidoreducere ale vitaminei B_1

și a esterilor lor fosforici *(G. Martin, 1955; K. Myrbäck și colab., 1945; O. Zima, G. Gottman, 1954)* dar se susține că forma disulfidică este inactivă și că ar necesita pentru activare o reducere enzimatică *(P. Karrer și colab., 1946; V. A. Engelhardt și colab., 1957; C. V. Holt și colab. 1957)*.

În *utilizarea în farmacie* este necesar să se cunoască o serie de particularități și incompatibilități ale vitaminei B_1.

Soluțiile injectabile sterilizate prin căldură conțin produși de descompunere decelabili; degradarea este accentuată prin creșterea pH-ului, a temperaturii de sterilizare și prin adăugarea de pirosulfiți.

Tiamina—HCl este *incompatibilă* cu numeroase substanțe: oxidanți, reducători, ioduri, carbonați, acetați, fosfat de sodiu, borax, clorura mercurică; formează precipitate cu iodul, acidul tanic, citratul de fier amoniacal; de asemenea, este incompatibilă cu soluțiile alcaline (fenobarbital sodic, sulfamide sodice, hidrogencarbonat de sodiu, citrat de sodiu, trometamol); cu alcaloizii-bază solubili; cu soluțiile de zaharuri (glucoză, lactoză); cu alcoolul; gelatină; cu acizii și sărurile acide (cu excepția acidului benzoic); este degradată de penicilină, ionii de cupru, glicerol (în concentrație de peste 70% în mediu alcalin o transformă în tiocrom, inactiv biologic).

De interes special sînt interacțiunile cu celelalte vitamine *(a se vedea și cap. 2.1.7.5)*. Riboflavina degradează vitamina B_1, de exemplu în siropurile polivitaminate, cu mențiunea că amestecul de sirop simplu : glicerol : apă (2 : 2 : 1) pare a fi cel mai potrivit vehicul pentru siropurile care conțin vitaminele B_1, B_2, B_6 și P.P. *(V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Metode de dozare. Teste. Dintre **metodele fizice, fizico-chimice și chimice** se pot menționa: spectrul în I.R. sau U.V. (absorbție maximă la 246 nm; F.R.IX); cu acid sulfanilic diazotat + formaldehidă → culoare roșie; cu p-aminoacetofenona diazotată se obține o coloratie roșie, extractibilă cu xilol; aplicarea pe urină sau alte produse naturale necesită, în prealabil, adsorbția și eluția de pe coloane de zeolit *(A. J. Hochberg, Melnik, M. L. Oser, 1945)*; cu picrolonat de litiu: pentru preparate farmaceutice; oxidarea cu hexacianoferat (III) de potasiu în mediu alcalin conduce la *tiocrom (fig. 2.38)* extractibil cu unii alcooli. F.R.IX prevede tratarea soluției de vitamină B_1 cu NaOH 10% (culoare galbenă), adăugarea de alcool butilic (sau amilic) și a fericianurii de K: după ce se agită puternic: stratul alcoolic prezintă o fluorescență albastră care dispare prin acidulare și reapare la alcalinizare.

Adaptări ale acestei metode servesc pentru determinarea vitaminei B_1 din alimente sau din produsele biologice; în asemenea cazuri este necesară îndepărtarea, prin adsorbție-eluție, a substanțelor fluorescente (cum sînt metaboliții vitaminei P.P. din urină).

Metoda prezintă interes special și prin posibilitatea determinării *tiaminei și a esterilor săi fosforici* din ser sau din alte materiale. Serul deproteinizat se trece prin coloană cu cărbune activ amestecat cu praf de celuloză și se eluează cu n-propanol; eluatul (concentrat la vid) se trece prin coloană Dowex 1 × 8. Eluarea coloanei cu diferite soluții tampon permite obținerea succesivă a patru fracțiuni: I = T; II = TMP; III = TDP (TPP) și IV = TTP, care se purifică pe coloane Amberlit IRC-50. Fracțiunile II—IV se incubează cu enzime, de exemplu, cu fosfatază acidă (sau takadiastază) în scopul scindării grupărilor fosfat și a eliberării tiaminei. Toate fracțiunile astfel obținute conțin tiamină, care se determină prin tratare cu hexacianoferat (III) de K în mediu alcalin, extragerea tiocromului format cu izobutanol și aprecierea fluorimetrică față de curbe etalon de tiamină (prelucrate similar) sau față de soluții de chinină, care manifestă o fluorescență similară *(B. Alexander, 1943; G. Rindi, L. Giuseppe, 1961)*.

Testele biologice urmăresc la porumbelul, puiul sau șobolanul carențat parametrii semnificativi: simptomele polinevritei; curba creșterii în greutate; bradicardia (avitaminoza B_1 determină la șobolanul tînăr bradicardie sinusală) etc. *(H. W. Kinersley, R. A. Peters, V. Reader, 1928; H. Deutsch, 1944)*.

Metodele microbiologice se bazează pe rolul de factor de creștere pentru unele microorganisme, ca de exemplu, *Phycomyces blakesleanus* (sensibilitatea: 0,01 μg tiamină), *Escherichia coli mutant* K_{12}, *Leuconostoc mesentheroides*, *Lactobaccilus fermenti*, *Streptococcus salivari*, *Neurospora crassa* (mutanți tiamindependenți) etc. *(E. G. Schultz și colab. 1940—1942)*.

Teste fitobiologice: creșterea rădăcinii de mazăre *(Pisum sativum)* cu o mare sensibilitate (10^{-5} μg), precum și diferite variante de determinare pe *Sacharomyces cerevisiae*.

Metode biochimice care urmăresc, în general, indicatorii dependenți de sistemele enzimatice cu carboxilază: *testul catatorulinic:* determinarea consumului de oxigen al creierului de porumbel, care este mai mic în carență și crește în paralel cu cantitățile de tiamină adăugate *(R.A. Peters și colab., 1938)*; *determinarea CO_2* format în cursul fermentației alcoolice pe *Sacharomyces cerevisiae*, anterior epuizată de cocarboxilază și la care se adaugă vitamina B_1 de dozat *(E. G. Schultz și colab., 1940—1941)*; la *apococarboxilaza inactivă*, izolată din cocarboxilaza de drojdie se adaugă TPP și se apreciază CO_2 produs din decarboxilarea substratelor adăugate (de exemplu, acid piruvic); o variantă a acestei metode folosește o reacție cuplată în care se utilizează apococarboxilaza, Mg^{2+}, piruvat de sodiu, ADH (din drojdie) și NADH și se urmărește scăderea absorbției caracteristică

NADH (la 340 nm); determinarea *transcetolazei* din eritrocite, de interes clinic, bazată pe constatarea că în carența tiaminică se înregistrează un blocaj al transcetolazei, cu acumularea pentozofosfaților într-o concentrație de trei ori mai mare decît la persoanele normale; determinarea *piruvicemiei*: valori peste 2,8 mg % la om ar putea indica o stare de avitaminoză, dar, în realitate hiperpiruvicemia poate fi condiționată și de alți factori, independenți de carența B_1 (febră, toxemii, boli cardiovasculare etc.) de aceea s-au preconizat metode care să elimine interferența acestor factori. Astfel, de exemplu, raportul: Lactacidemie (L)/piruvicemie (P), cînd valorile sub 7 pot indica o carență de vitamină B_1. Deoarece nici acest test nu este destul de specific pentru avitaminoza B_1 se recomandă asocierea cu „proba de încărcare cu glucoză" (care trebuie aplicată cu precauție, pentru a nu agrava starea de acidoză) și determinarea glicemiei (G). Se stabilește astfel: *Indicele metabolismului glucidic*: $\frac{1}{2}\left|L-15P-\frac{G}{5}\right|$, cu valori sub 15 pentru persoanele normale și mai mari pentru cele carențate în vitamină B_1 *(M. K. Horwitt, U. Kreissler, 1949)*.

În *laboratorul clinic* se dozează și *vitaminuria* B_1 (normal: 50—250 μg/zi) și *TDP* (TPP) din globulele roșii (normal: 7,5 μg/100; valorile sub 3 μg/100 indică stări de carență).

Unitatea internațională (U.I.) corespunde la 3 μg clorhidrat de tiamină (1 mg = 333 U.I.).

2.1.7.4. *METABOLISMUL VITAMINEI* B_1

Organismele se comportă diferit în privința biosintezei și necesităților în tiamină: vertebratele, ciupercile și unele microorganisme sînt incapabile de sinteză; unele levuri sintetizează vitamina B_1 cînd au la dispoziție cei doi cicli și, în unele cazuri, cînd primesc numai unul; majoritatea microorganismelor sînt capabile de sinteza totală a vitaminei B_1. O parte din vegetale primesc tiamina de la microorganismele simbiotice (radiculate); prezența tiaminei în sol se explică prin secreția microbiană și vegetală, ea fiind considerată ca un „hormon vegetal"; plantele crescute la lumină conțin mai multă vitamină decît cele care trăiesc la întuneric.

Cele mai sensibile vertebrate la carența tiaminică sînt omul, șobolanul, cîinele, pisica, porcul, vițele, găinile, porumbelul. În interpretarea corectă a *necesităților* de vitamină B_1 trebuie să se țină seama de faptul că unele microorganisme din flora intestinală sînt producătoare și altele consumatoare de tiamină; în condiții de eubioză, debitul total depășește aportul exogen; în disbioză (alterarea florei intestinale), debitul poate fi mai mic și să cauzeze astfel o carență B_1.

Deși se consideră că animalele nu sintetizează tiamina, totuși, omogenatele de rinichi sau ficat de iepure sînt capabile, *in vitro* să realizeze sinteza parțială din 4-metil-5β-hidroxietil-tiazol și clor-mezil-pirimidină *(F. Caciopo și colab., 1953)*.

Absorbția se face la nivelul intestinului subțire, unde are loc, într-o oarecare măsură, și pirofosforilarea la TDP (TPP).

Sîngele adultului conține 7—15 μg tiamină/100 ml (valorile sub 3—4 μg/100 ml indică o carență), dintre care 90% fosforilată și restul liberă; tiamina liberă (T) se găsește în special în lichide (plasmă, L.C.R.) iar cea fosforilată (TDP) în țesuturi și celule, respectiv în elementele figurate ale sîngelui: 20 μg/10^{12} eritrocite și 3.400 μg/10^{12} leucocite.

Convertirea tiaminei libere la cocarboxilază (TDP=TPP), *forma activă* (enzimatic), are loc în celulele nucleate (intestin, ficat, rinichi) sub influența tiaminkinazelor; de exemplu, tiaminpirofosfokinaza transferă restul pirofosforic de pe ATP pe tiamină, funcționînd deci ca o ATP-tiaminotranspirofosforilază. Această enzimă poate fi deficitară în unele stări patologice, de exemplu în

Scanned with OKEN Scanner

diabetul zaharat (cu scăderea nivelului cocarboxilazei hepatice); alterări ale raportului T față de esterii săi fosforici: TMP, TPP, TTP *(cap. 2.1.7.3)*, cunoscut și sub denumirea de „curba de relație a tiaminei și esterilor săi fosforici", apar într-o serie de stări patologice, ca de exemplu boli hepatice, nervoase, cardiace, infecțioase etc. *(I. Manta și colab., 1964—1970)*.

În organismul uman se găsesc aproximativ 25 mg tiamină, în majoritate (90%) ca TDP (TPP), forma activă enzimatic (cocarboxilază) și de stocare, de scurtă durată (în ficat, rinichi, în cantitate de 2,2—2,4 μg/g și în mușchiul cardiac: 3,6 μg/g). Prin defosforilare apare tiamina liberă, care este vehiculată prin sînge spre diferite țesuturi (organe), unde se transformă din nou în cocarboxilaze (TDP=TPP), legate cu proteine specifice (carboxilaze).

Injectarea tiaminei dublu marcată (^{35}S și ^{14}C în poziția 2 a tiazolului) arată 60% din radioactivitate în urină sub forma a 5 derivați, între care T, TPP și un derivat thioctic; în cantități mai mici se găsește și un derivat pirimidinic cu efecte de creștere pentru levuri; o parte din sulful vitaminei apare sub formă de sulfuri, dovadă a catabolismului avansat al părții tiazolice.

Calea majoră de eliminare este deci excreția urinară (50—250 μg/zi, în special ca tiamină liberă); se consideră că la 1 mg tiamină alimentară corespunde o excreție urinară de 130 μg. În eliminarea prin fecale nu se poate stabili o relație cu cantitatea ingerată, deoarece unele microorganisme din flora intestinală o produc *(Esch. coli, Bac. lactis aerogenes* etc.) iar altele o consumă; este probabil ca o parte din vitamina B_1 din fecale să reprezinte cantitatea neabsorbită. O altă cale de eliminare (importantă) este prin transpirație (de exemplu, la sportivi 15 μg/zi) și care poate determina, în transpirații excesive, o stare specială de carență „sindromul neuropatic tropical".

2.1.7.5. *ROL BIOCHIMIC. INTERRELAȚII*

Primele date asupra rolului vitaminei B_1 în procesele metabolice semnalau, în carența tiaminică, creșterea acumulării și respectiv a excreției unor compuși cu 3 atomi de carbon: acidul lactic în creierul porumbeilor *(H. W. Kinnensley, R. A. Peters, 1929)*; a acidului piruvic și a corpilor cetonici la persoanele cu beri-beri *(Platt, Lu)* și a metilglioxalului în laptele și urina mamelor carențate *(Geiger, Rosenberg, 1935)*.

La elucidarea importanței și mecanismului de acțiune biochimică a vitaminei B_1 a contribuit constatarea că feliile de țesut cerebral de la porumbeii carențați manifestă un consum de oxigen (respirație tisulară) scăzut, concomitent cu acumularea de acid piruvic (care se „normalizează" prin adăugarea de tiamină), precum și stabilirea faptului că TDP (TPP) constituie partea activă (cocarboxilază) a unor enzime (carboxilaze). Sub această formă, cocarboxilazele participă în următoarele reacții metabolice (enzimatice):

Enzima	*Reacția catalizată:*
Complex Piruvat-dehidrogenază:	Piruvat → Acetil-CoA + CO_2
Piruvat-decarboxilază (drojdie):	Piruvat → Acetaldehidă + CO_2
Complex α-Cetoglutarat- DH:	α-Cetoglutarat → Succinil-CoA + CO_2
Transcetolază:	Xilulozo-5-(P) + Ribozo-5-(P) ⇌ Sedoheptulozo-5-(P) + GlyAld-3-(P)

Interrelații vitaminice și hormonale. Carența vitaminei A agravează simptomele avitaminozei B_1; vitamina B_6 „economisește" tiamina la unele microorganisme; excesul de vitamină P.P. și acid folic împiedică efectul vitaminei B_1 de vindecare a polinevritei aviare (prin inhibarea fosforilării tiaminei); dozele mari de vitamină B_1 agravează carența P.P. și B_6 iar vitamina B_{12} crește necesitățile de vitamină B_1. Vitamina C are un efect de cruțare a tiaminei și de protejare față de carența B_1, în timp ce vitamina C_2 (flavonoide) accelerează distrugerea sa (probabil prin activarea tiaminazelor), de aceea pigmenții care au în poziția orto două grupări hidroxilice pe nucleul benzenic, cum sînt compușii flavonici (rutină, astragalin, izoquercetol), sînt considerați ca „antivitamine B_1 naturale".

Antibioticele (de exemplu, penicilina) scad necesitățile în vitamină B_1 ale șobolanului carențat, probabil prin distrugerea unor microorganisme consumatoare de tiamină din flora intestinală, însă, *la om*, terapia cu antibiotice și sulfamide *per os* necesită suplimentarea cu tiamină.

Tiamina inhibă formarea și/sau activitatea colinesterazei, enzimă de scindare a acetilcolinei și favorizează astfel transmiterea influxului nervos; pe de altă parte, prin excitarea nervilor periferici se eliberează tiamină.

În carența vitaminei B_1, hipofiza este redusă, și, în consecință se înregistrează o scădere a activității glandelor endocrine hipofizodependente. După unele păreri, hiperpiruvicemia șobolanilor carențați în vitamină B_1 ar fi, inițial, datorită stimulării corticosuprarenalelor (stress) și numai după aceea ca efect direct al insuficienței tiaminei în sistemele enzimatice implicate în metabolismul piruvatului *(G. Rindi, V. Perro, G. Ferrari, 1955)*.

2.1.7.6. *HIPO- ȘI AVITAMINOZA B_1. NECESITĂȚI. HIPERVITAMINOZA*

Vitamina B_1 din alimente asigură necesitățile, în măsura în care nu este distrusă prin prelucrarea alimentelor: prin coacere (în pîine) se pierde 30%; prin fierbere (trece în lichide), care, dacă nu se consumă ca aliment, duc la pierderi mari; prin conservare (pierderi de 3—60%), prin deshidratare (de exemplu, în laptele praf se pierde 30%), prin congelare, prin tratare cu sulfiți, în cazul alimentelor care conțin acid cafeic etc.

Șobolanul necesită un aport de 3—7 μg/zi, iar vindecarea porumbeilor cu polinevrită, 3—10 μg/zi.

Necesitățile umane sînt condiționate de o serie de factori, ca de exemplu, vîrsta, tipul de alimentare, munca depusă, regiunea geografică etc. și se apreciază a fi 0,35 mg/1.000 kcal, respectiv 1 mg/zi (minim) pînă la 2,5 — 3mg/zi (optim). Cercetările pe studenți au arătat că după un regim sărac în vitamină B_1 timp de 15 zile, apar semnele biochimice ale carenței *(G. Brubacher, A. Haenel, G. Ritzel, 1972)* și se apreciază că, în ansamblul populației, există o subcarență de tiamină, persoanele în vîrstă fiind mai puternic afectate *(D. L. Scott, W. F. Koerner, 1968)*.

Regimul lipidic economisește vitamina B_1, în schimb cerințele sînt mult mai mari în regimul bogat în glucide (se consideră că în metabolizarea a 100 g glucide se consumă 1 μg tiamină) și, în consecință, carența poate apare la bolnavii digestivi cu regim de făinoase; la alcoolici (alcoolul crește numitorul raportului: vitamină B_1/calorii); la sugarul hrănit cu fierturi pe bază de pre-

Scanned with OKEN Scanner

parate de făină cernută, lapte praf, lapte de vacă sau la sugarii alimentaţi de mamele carenţate.

Necesităţi crescute apar şi într-o serie de condiţii patologice: tulburări de absorbţie (inclusiv în administratrea medicamentelor sau a apelor minerale alcaline care neutralizează aciditatea gastrică); în colite ulcerative, atrofii şi inflamaţii ale mucoaselor, fistule, scurtări intestinale; în bolile „metabolice" (diabet, cu scăderea tiamin-pirofosforilării); în bolile infecţioase, considerîndu-se că deficitul în tiamină scade rezistenţa faţă de infecţii (la şoarece faţă de *Salmonella typhimurium*; la şobolan faţă de pneumococul tip I, baccilul leprei, ricketzii şi diferite protozoare).

Avitaminoza experimentală la animale se caracterizează prin încetarea creşterii, tulburări digestive, nervoase şi cardiace. Porumbelul manifestă „polinevrita aviară" cu afectarea muşchilor şi penajului (nu mai pot zbura), bradicardie, ataxie cerebeloasă (cu creşterea acidului piruvic şi lactic), opistotonus, crize convulsive; la şobolan apar, în special, tulburări de creştere şi ale ritmului cardiac.

Avitaminoza umană se poate manifesta în forme variate:

Avitaminoza experimentală, cu un tablou diferit de al carenţelor naturale: anorexie, slăbire, oboseală fizică şi intelectuală, scăderea secreţiei gastrice, constipaţie, anemie, inimă mărită, cu tulburări cardiace, dar fără fenomene nervoase (polinevrită).

Encefalopatia Gayet—Wernicke (descrisă la sfîrşitul secolului trecut la alcoolicii cronici) se aseamănă cu avitaminoza pură produsă prin tiaminază. Ea poate fi cauzată de vărsăturile incoercibile, infecţii, intoxicaţii, neoplasme, care duc la denutriţie, epuizare, stări agravate de alcoolism. Între simptomele ilustrative se înscriu tulburări vizuale, stare de slăbire, lipsa reflexelor osteotendinoase, confuzii mintale, hemoragii; anatomic, se înregistrează poliencefalită superioară cu focare de congestie hemoragică şi degenerescenţă în talamus, hipotalamus, planşeul ventriculului al IV-lea, de unde şi denumirile de „encefalopatie hemoragică" şi „beri-beri central".

Sindromul neuropatic tropical (Africa de Sud, Egipt, India), cauzat de pierderile excesive de tiamină prin transpiraţie, cu tulburări digestive, neurologice şi cutanate (hiperkeratoză foliculară caracteristică).

Beri-beri, forma cea mai importantă şi răspîndită, reprezintă o stare de carenţă cronică ce poate dura ani de zile; la un moment dat, în urma unor condiţii favorizante ale carenţei, ca de exemplu munci fizice grele, stări patologice (febră tifoidă, dizenterie, pneumonie) sau malnutriţii grave, ea devine manifestă (acută).

Avitaminozele grave îmbracă forme diferite: *Beri-beri uscat* (paralitic) cu tulburări nervoase (polinevrite ale membrelor), cardiace, atrofie musculară. Bolnavul este foarte slab, cu paralizii ale picioarelor şi cu mersul greu („beri-beri" înseamnă „cătuşe la picioare" în limba indiană) cu paralizii ale mîinilor („în gheară"), dureri musculare profunde, tremurături, constipaţii rebele.

Beri-beri hidropic, (edematos, cardiovascular), o miocardiopatie de carenţă cu hipertrofia inimii, tahicardie constantă, palpitaţii, dureri precardiale, dispnee, edem generalizat. Ca mecanism al edemului, se consideră că pentru a compensa „fuga capilară", determinată de creşterea permeabilităţii (probabil legată de hiperpiruvicemie), şi pentru a creşte debitul cardiac, se produce o accelerare a ritmului cardiac şi rezultă astfel o mărire a volumului sanguin (pe fondul unei diureze normale); apare astfel o „insuficienţă cardiacă de origine periferică" *(Langeron)* care nu răspunde la tonicardiacele uzuale (digitalice, strofantina).

Scanned with OKEN Scanner

Această miocardoză, cu predominanţă dreaptă (ventriculul drept mărit) constituie manifestarea esenţială a formei de beri-beri cu prognostic grav *(H. Gouenelle, C. Marnay, 1965)*. Bolnavul are corpul şi în special faţa „umflată" (edemaţiată) şi prezintă vărsături, respiraţie alterată şi stări repetate de asfixie şi sufocare, care îi imprimă o spaimă continuă de moarte.

Beri-beri difuz, cu manifestări mai puţin caracteristice: dureri musculare, astenie, similare reumatismului, cu care se poate confunda; de altfel, boala reumatismală beneficiază de terapia cu vitamină B_1.

Hipovitaminozele, formele mai uşoare, se manifestă prin tulburări funcţionale ale sistemului nervos, pierderea apetitului şi atenţiei, oboseală fizică şi intelectuală şi afecţiuni gastrointestinale: greaţă, dispepsie, constipaţii rebele şi pierderi în greutate.

Beri-beri a noului născut (sugarului), destul de răspîndit încă în Extremul Orient, se datoreşte carenţei materne şi se poate manifesta sub forme diferite, similare adultului: *cardiac*, cu asistolie acută şi dispnee, agitaţie, cianoză, tahicardie (pînă la 200 bătăi/minut) şi hepatomegalie; *nervos-acut*, cu paralizia nervilor cranieni, afonie, convulsii, stare semicomatoasă; *cronic*, cu tulburări digestive: regurgitări, anorexie, constipaţie şi edeme.

Hipervitaminoza B_1 este o stare de excepţie, deoarece adultul tolerează doze de 500 mg tiamină/zi timp de o lună. Totuşi, cantităţile foarte mari pot avea efecte curarizante, iar la unele persoane, care manifestă „idiosincrazie" la tiamină, chiar la dozele uzuale pot apare fenomene alergice, nervozitate, ameţeli, eriteme, dureri gastrice, vărsături.

2.1.7.7. *INDICAŢII TERAPEUTICE*

Preparatele de vitamină B_1 îşi găsesc largi aplicaţii, atît în toate formele de carenţă, cît şi în pediatrie, în creşterea rezistenţei la infecţii, toxemii, dispepsii; la gravide şi în cursul alăptării (necesităţi crescute); în nevrite şi polinevrite şi respectiv în tulburările neurologice din pelagră, în paraliziile nervului oculo-motor şi corneei (în asociere cu vitamina A), în nevritele din herpesul zooster, în nevralgii, migrene; în boala reumatismală (artrite reumatismale, algiile reumatismale); în afecţiunile cardiace: insuficienţă cardiacă, miocardite, miocardozele din graviditate, alcoolism, hipertiroidism; în sclerozele amiotrofice laterale şi stările degenerative ale bătrînilor; în stările febrile (prelungite) şi convalescenţe; în diabetul zaharat; în afecţiunile hepatice (hepatite acute şi cronice) şi pentru stimularea funcţiei detoxefiante a ficatului, de exemplu, în intoxicaţia cu alcool; în dermatologie, în diverse dermatoze, lichen plan etc.

Cocarboxilaza. **În terapia modernă se utilizează preparatele de *cocarboxilază* (fiole de 50 mg) în bolile însoţite de hiperpiruvicemie (în care se înregistrează un deficit al pirofosforilării tiaminei şi deci lipsa de eficienţă a acesteia), cu efecte de scădere a piruvicemiei şi corpilor cetonici şi de normalizare a rezervei alcaline. Indicaţiile majore, cu avantaje faţă de tiamină, sînt în diabet (precomă, comă, acidoză, rezistenţa la insulină, şoc insulinic); la gravide (eclampsii, toxicoze) şi în diferite acidoze (toxicozele sugarului; în timpul şi după narcoză etc.); în intoxicaţiile cu gaze şi somnifere; în roentgenterapie; în decompensările cardiace şi circulatorii; în nevralgia trigemenului, nevrite, polinevrite, lumbago (scade senzaţia dureroasă); în sclerozele multiple; în herpes zooster etc.**

2.1.8. RIBOFLAVINA. VITAMINA B_2. LACTOFLAVINA

Semnalarea unui factor implicat în metabolismul glucidic *(L. Randoin, H. Simonnet, R. Lecoq, 1926)*, separarea din „vitamina B" a unui factor termostabil, diferit de vitamina B_1 termolabilă *(J. Goldberger, R. D. Lilie, 1926)*, observaţia că creşterea în greutate a animalelor este proporţională cu cantitatea unui pigment galben-fluorescent *(R. Kuhn, P. György, T. Wagner-Juaregg, 1933)* au condus la descoperirea vitaminei B_2, identificată cu o flavină. Flavinele erau cunoscute anterior

şi denumite după proveniența lor: ovoflavine, hepatoflavine, lactoflavine („lactocromul" izolat din lapte de către *A. W. Blyth, 1879* şi de către *B. Bleyer şi O. Kallmann, 1925*); „liocromul" *(Ellinger, Koshara, 1933)*; riboflavină (din drojdie). După stabilirea identității structurii lor, confirmată prin sinteză totală, s-a propus denumirea generică de *„riboflavine"*, respectiv *vitamina* B_2 *(R. Kuhn; P. György; Th. Wagner-Juaregg; W. Weigand şi colaboratorii lor, 1933—1935; P. Karrer, 1934—1936)*. Carența vitaminei B_2 a fost semnalată prin cercetări experimentale la şobolan (încetarea creşterii, tulburări oculare şi dermice). De o mare importanță biologică a fost descoperirea rolului de coenzimă a vitaminei B_2 în „fermentul respirator galben vechiu" *(O. Warburg, W. Christian, 1931—1933)* şi în numeroase alte sisteme enzimatice cu flavine *(H. Theorell, 1934)*.

2.1.8.1. *STRUCTURA RIBOFLAVINEI. PREPARARE*

Molecula vitaminei B_2 este alcătuită dintr-o structură triciclică, *izoaloxazina* (izomer cu aloxazina); 6,7-dimetil-aloxazina constituie *lumicromul* (Lc), iar 6,7,9-trimetil-izoaloxazina reprezintă *lumiflavina* (Lf). Prin atașarea în poziția 9 a unui rest D-ribitil se obține *vitamina* B_2, *riboflavina*, cu structura: 6,7-dimetil-9-(-1'-D-ribitil)-izoaloxazina. Prin esterificare cu acid fosforic se obține acidul riboflavin-fosforic sau *flavin-mono-nucleotid* (FMN) care, legat cu acidul adenozin-monofosforic (AMP), dă *flavin-adenin-dinucleotidul* (FAD) (fig. 2.40); acestea reprezintă formele active ale vitaminei, în calitate de coenzime ale flavinenzimelor. În structura unor enzime, legarea cu partea proteică se face prin NH/3 şi un rest fosforic, în altele, covalent, prin intermediul $-CH_2-$ din 7, de exemplu cu N-imidazolic al *His* în succindehidrogenază sau cu —S din Cis, în monoaminooxidază (MAO); în numeroase cazuri flavinenzimele leagă şi oligometale (Fe, Mo etc.).

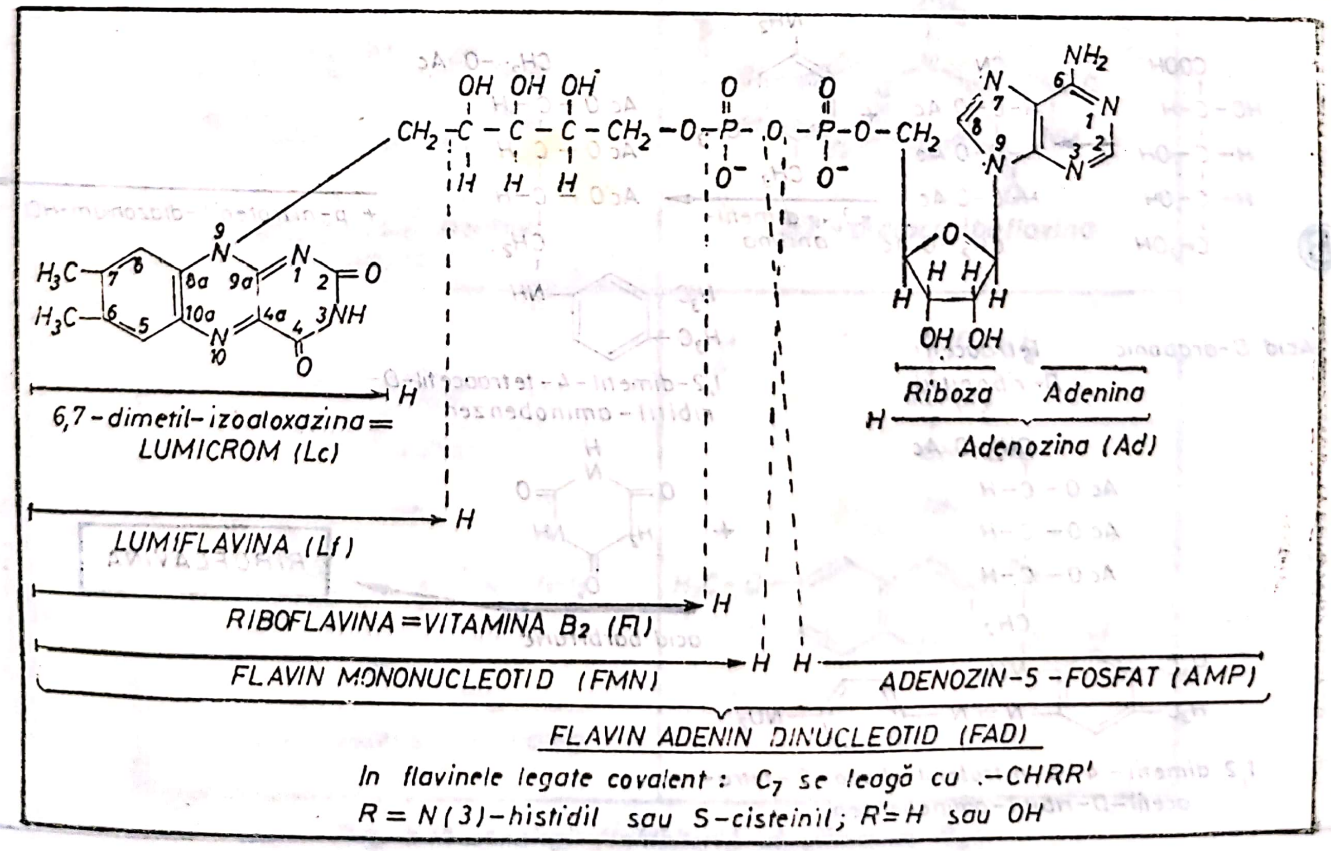


Fig. 2.40. Structura vitaminei B_2, a derivaților şi coenzimelor sale

Preparare. Vitamina B_2 poate fi obținută din ficatul de bou, drojdie, zer de lapte; surse rentabile sînt lichidele de fermentație a unor microorganisme, de exemplu, *Eremothecium Ashbyii* (cap. 2.1.8.4) produce 86 mg riboflavină/litru, dar incubarea durează 3 săptămîni. Fazele de extracție sînt similare celor de la vitamina B_1 și implică, în principiu, precipitarea din soluțiile apoase cu acetat de Pb, acid fosfotungstic și săruri de Ag; precipitatul argentic eliberează vitamina prin tratare cu HCl; purificarea se face prin adsorbție și eluare cu soluție diluată de piridină, obținerea complexului argentic și eliberarea din acesta cu H_2S.

Prin sinteză, se condensează 1,2-dimetil-4-amino-5(D-1'-ribitilamino) -benzenul (obținut din o-xilen, subprodus al industriei petrochimice, și riboză, respectiv ribitol, extras din vegetale) cu aloxanul, în mediu acid și în prezență de acid boric drept catalizator *(fig. 2.41.A)*.

În prezent, se preferă metoda hidrogenării N-glicozidului din 3,4-xilidină și D-riboză în 1-(D-ribitilamino)-3,4-dimetilbenzen, urmat de cuplarea sării de benzendiazoniu și condensarea cu acid barbituric *(fig. 2.41.B) (M. Tishler și colab., 1945, 1947)*.

Din riboflavină se obține FMN prin reacția cu un amestec echimolecular de voxiclorură de fosfor în apă iar FAD se poate obține direct din FMN cu adenozin-5'-fosforoamidat (randament 40%) sau din sarea de argint a FMN cu anhidrida adenozin-5'-fosforic-di-n-butilfosfinotioică (randament 67%).

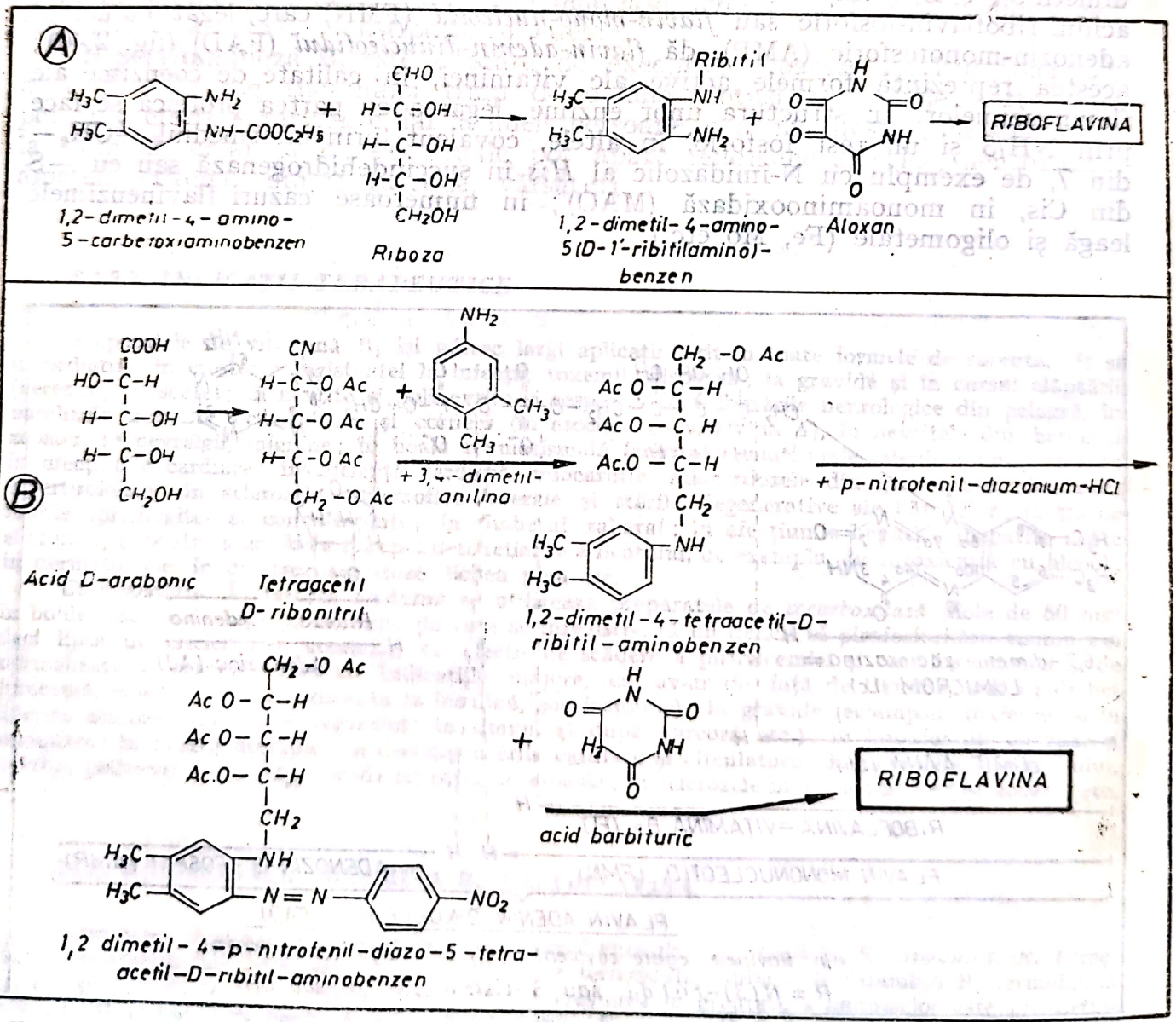


Fig. 2.41. Sinteza vitaminei B_2 pe două căi: A și B (după K. Ababei, M. Trandafirescu, 1974)

2.1.8.2. *RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINELE* B_2

Activitatea vitaminică implică unele caracteristici ale moleculei, a căror alterare conduce la diferite tipuri de antivitamine *(fig. 2.42) (P. Karrer, 1936, 1939; G. A. Emerson și colab., 1944 — 1945; D. W. Wooley și colab., 1944; R. Kuhn, F. Weigand, F. E. Möller, 1943, 1954; E. E. Snell și colab., 1953; J. B. Lamboy, 1954 — 1958).*

Nucleul izoaloxazinic conferă culoarea galbenă și fluorescența galben verzuie, în domeniul de pH 3—9 *(cap. 2.1.8.3)*. Forma redusă, incoloră (leucoderivat) este autooxidabilă (aer, lumină), conducînd la forma oxidată (galbenă), un bun acceptor de H *(fig. 2.44)*, care primește specificitate de substrat și activitate crescută prin legarea cu diferite proteine (flavinenzime). Substituirea H de la N/3 face să dispară fluorescența, de aceea numeroase enzime flavinice nu sînt fluorescente, deoarece legarea proteinelor se face la acest nivel.

D-ribitilul conferă moleculei stabilitatea, solubilitatea în apă, activitatea optică și capacitatea de esterificare cu acidul fosforic, pentru formarea coenzimelor active; prin înlocuirea restului fosforic cu sulfat se obține riboflavin-monosulfatul, antivitamină.

Înlocuirea D-ribitilului cu forma L dă un compus inactiv pe șobolan; cu galactil (galactoflavina), un antagonist; derivatul cu D-aribitil, are activitate

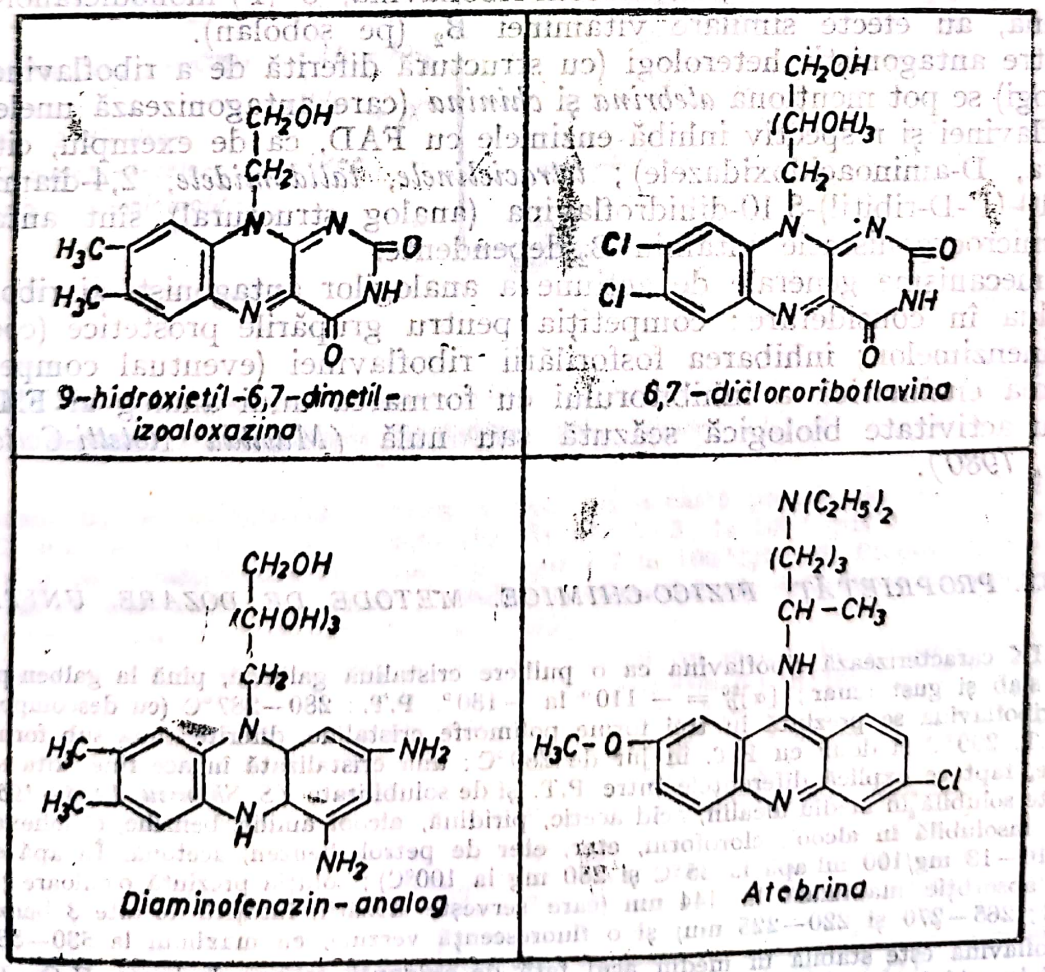


Fig. 2.42. Analogi (inhibitori) ai vitaminei B_2

scăzută pe microorganisme şi este antivitamină pentru şobolan; de asemenea înlocuirea cu 3', 4', 5'-trideoxi-ribitilul duce la o antivitamină. Derivatul cu lixil (lixoflavina), izolat din miocardul uman *(E. S. Pallares, H. M. Garza, 1949)*, în cantităţi fiziologice, are efecte vitaminice, în timp ce la concentraţii excesive se comportă ca un antagonist competitiv al riboflavinei. Derivaţii în care ribitilul este scindat pînă la resturi cu 2 atomi de carbon, ca de exemplu 9-formil-metil sau 9-2'-hidroxietil, sînt antagonişti ai vitaminei B_2 pe *L. casei* şi şobolan.

Substituiri în poziţia 6 şi/sau 7. Suprimarea unuia din cei doi metili (din 6 sau 7) duce la *izoriboflavine*, antivitamine pentru şobolan şi unele microorganisme; efecte similare prezintă şi 6,7-dietil-riboflavina şi 6-metil-7-aminoflavina (7-amino-izoriboflavina). Prin înlocuirea unui $-CH_3$ cu brom sau clor (de exemplu, 6- sau 7-Cl-izoriboflavina) se obţin antagonişti pentru *L. casei*. 6,7-diclor-derivatul inhibă creşterea *Staphilococului aureus, Staphilococului plantarum, B. lactis acidi* şi *Eremothecium Ashbyii* (fără a afecta producţia de riboflavină a acestuia), dar nu inhibă levurile. 6,7-diclor-9-*(1'-D-sorbitil)*-izoaloxazina este inactivă pe şobolan şi manifestă un efect de regresie a limfosarcomului implantat la şoarece; se cunosc şi alte flavine, antagonişti ai riboflavinei, cu activitate antitumorală, împiedicînd, de exemplu, dezvoltarea cancerului mamar spontan al şoarecelui *(Lettré, 1940)*. *Flavotina:* 9-(1'-D-sorbitol)-izoaloxazina inhibă *in vivo* activitatea xantinoxidazei din tumori dar nu afectează enzima din ţesuturile normale *(L. S. Dietrich, D. M. Shapiro, 1953)*.

Monometilol-riboflavina, tetraacetil-riboflavina, 5'-(P)-monodietanol-aminoriboflavina, au efecte similare vitaminei B_2 (pe şobolan).

Dintre antagoniştii heterologi (cu structură diferită de a riboflavinei, deci nonanalogi) se pot menţiona *atebrina* şi *chinina* (care antagonizează unele efecte ale riboflavinei şi respectiv inhibă enzimele cu FAD, ca de exemplu, citocromreductaza, D-aminoacidoxidazele); *tetraciclinele, talidomidele*, 2,4-diamino-7,8-dimetil-10-(1'-D-ribitil)-5,10-dihidroflavina (analog structural) sînt antagonişti pentru microorganismele vitamin B_2-dependente.

Ca mecanisme generale de acţiune a analogilor antagonişti ai riboflavinei se pot lua în considerare: competiţia pentru grupările prostetice (coenzime) ale flavinenzimelor; inhibarea fosforilării riboflavinei (eventual competitivă); fosforilarea enzimatică a inhibitorului cu formarea unui analog al FMN (sau FAD) cu activitate biologică scăzută sau nulă *(Matilda Rotetti-Colţoiu, D. Oţeleanu, 1980)*.

2.1.8.3. *PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE. UNITĂŢI*

F.R.IX caracterizează riboflavina ca o pulbere cristalină galbenă, pînă la galben-portocaliu cu miros slab şi gust amar; $[\alpha]_D^{20} = -110°$ la $-130°$. P.T.: 280—287°C (cu descompunere); în realitate riboflavina se prezintă în trei forme polimorfe cristaline, diferite: una sub formă de ace fine cu P.T. 290°C şi două cu P.T. în jur de 280°C: una cristalizată în ace fine, alta sub formă de plăcuţe, fapt ce explică diferenţele între P.T. şi de solubilitate *(S. Shimizu, 1956—1957)*. Riboflavina este solubilă în mediu alcalin, acid acetic, piridină, alcool amilic, benzilic, ciclohexanol, fenol şi practic insolubilă în alcool, cloroform, eter, eter de petrol, benzen, acetonă. În apă este puţin solubilă (10—13 mg/100 ml apă la 25°C şi 250 mg la 100°C); soluţia prezintă o culoare galbenă, cu picul de absorbţie maximală la 444 nm (care serveşte dozării) însoţită de alte 3 benzi în U.V. (365—372; 265—270 şi 220—225 nm) şi o fluorescenţă verzuie, cu maximul la 530—560 nm.

Riboflavina este stabilă în mediu acid faţă de oxidanţi, ca apa de brom, H_2O_2, HNO_3, dar nu rezistă la acidul cromic, persulfaţi, permanganat şi nici la agenţii reducători.

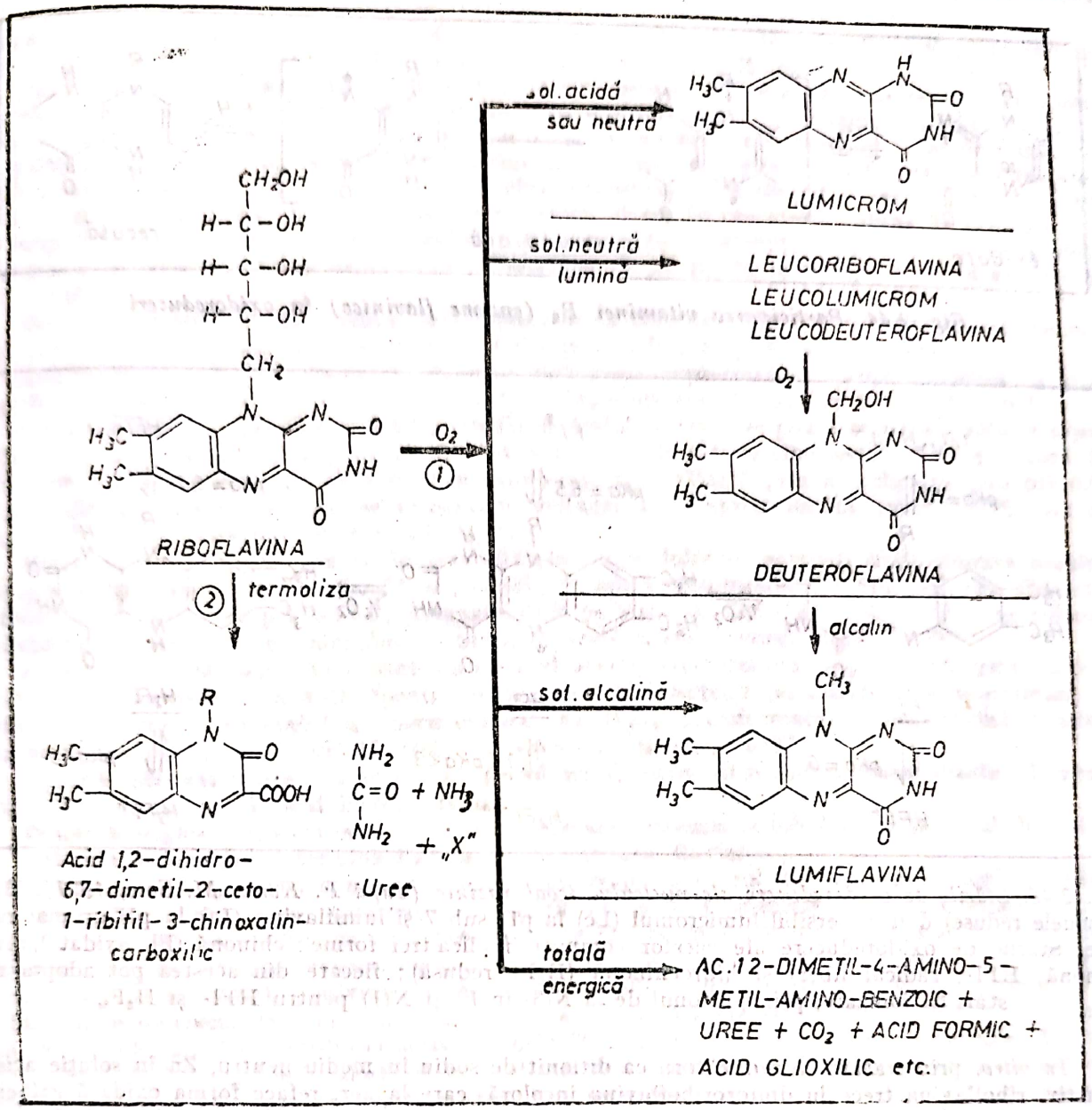


Fig. 2.43. Descompunerea riboflavinei prin oxidare (1) şi termoliză (2)

Vitamina B_2 este considerată ca termostabilă, dar această proprietate este pH-dependentă: este stabilă *timp de o oră* la 120° în domeniul de pH 2—5; la 100° (pH 1,7—5,5); la 80° (pH 1,3—6,5) şi pierde jumătate din activitate peste pH 8,7 la 100°C/1 oră. Produşii termolizei, similari cu cei din hidroliza acidă, sînt acidul 1,2-dihidro-6,7-dimetil-2-ceto-1-D-ribitil-chinazolin-carboxilic, NH_3 şi o serie de produşi neidentificaţi *(fig. 2.43)*.

Vitamina B_2 este foarte sensibilă la acţiunea luminii (în special în domeniul 365—590 nm), transformîndu-se în *lumiflavină* (în mediu alcalin), în *lumicrom* (în mediu acid şi neutru), produşi solubili în cloroform, proprietate ce permite separarea de riboflavină (insolubilă) la care se adaugă şi alţi produşi; în condiţii de fotoliză mai energică, molecula se degradează pînă la uree, CO_2 şi 1,2-dimetil-4-amino-5-metil-aminobenzen, iar în fotoliza accelerată de fier, în prezenţă de oxigen, o parte din vitamină se descompune pînă la acid formic şi acid glicolic *(fig. 2.43)*

O proprietate deosebit de importantă este capacitatea de *oxidoreducere* (potenţial redox, $E_0 = -0{,}185$ V); forma oxidată este de culoare galbenă, cea redusă este incoloră (leucoderivat). Pe baza acestei proprietăţi, riboflavina ca atare, FMN, FAD (coenzime) şi acestea legate cu proteine specifice (enzime flavinice) joacă un rol esenţial în procesele de oxidoreducere celulară; fixarea H se face, reversibil, la N din poziţiile 1 şi 10 *(fig. 2.44)*. În afară de acest mecanism se cunosc şi altele *(fig. 2.45)*, cu sau fără implicarea unor oligometale (Fe, Mo etc.) *(fig. 2.47)*

Scanned with OKEN Scanner

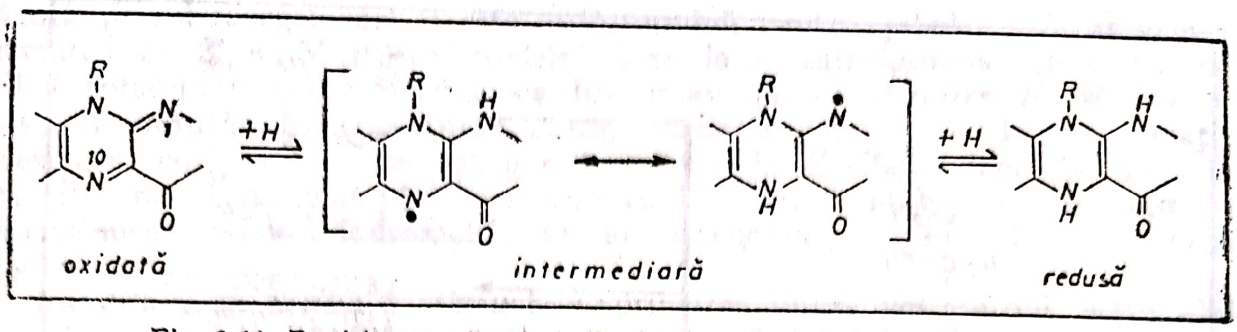


Fig. 2.44. Participarea vitaminei B_2 (enzime flavinice) în oxidoreduceri

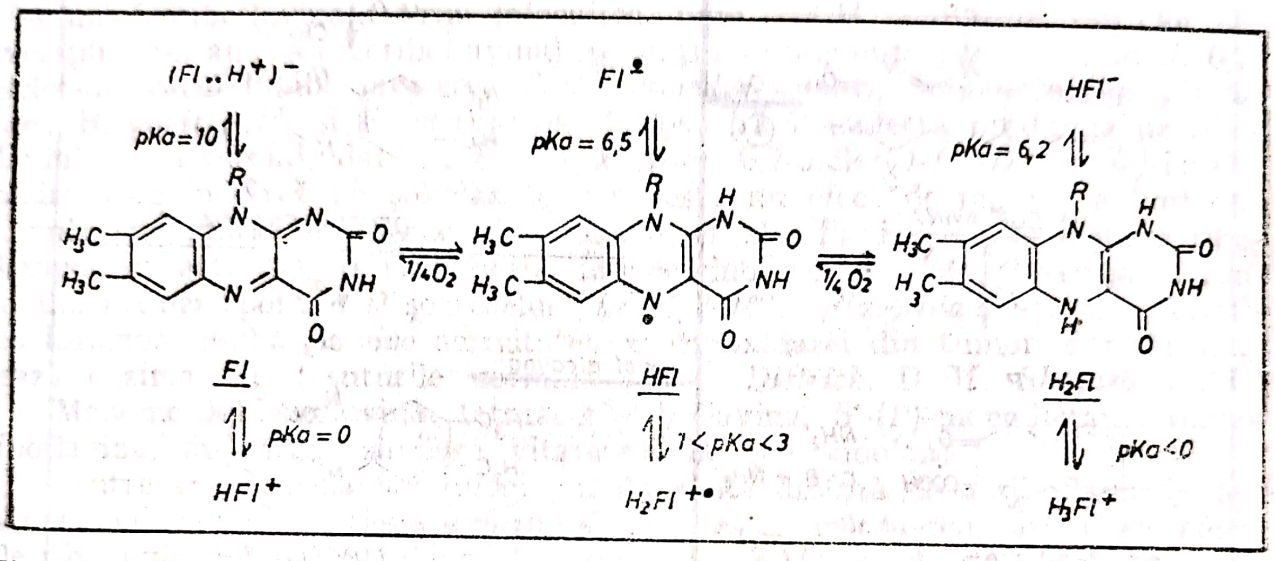


Fig. 2.45. Stările de oxidoreducere ale nucleului izoaloxazinic (după F. Korte, M. Goto, 1977). H_2F (flavinele reduse) dau ireversibil lumicromul (Lc) la pH sub 7 și lumiflavina (Lf) la pH-uri mai ridicate. Stările de oxidoreducere ale acestor compuși implică trei forme: chinonă (Fl, oxidată), semichinonă (HFl·, radical liber) și hidrochinonă (H_2Fl, redusă); fiecare din acestea pot adopta trei stări de ionizare, prin protonul de la N(3) în Fl și N(1) pentru HFl· și H_2Fl.

In vitro, prin tratare cu reducători, ca ditionit de sodiu în mediu neutru, Zn în soluție acidă, H activ, riboflavina trece în dihidroriboflavina incoloră, care la aer, reface forma oxidată galbenă, dar prin reducere catalitică cu H_2/Pt se obțin produși de hidrogenare mai avansați, incolori, ca de exemplu, octahidroflavine (cu o dublă legătură), care se transformă în hexahidroflavină stabilă (cu două duble legături).

Flavinele, datorită deficitului electronic pot reacționa prin C/2 și C/4 cu reactivii nucleofili, iar dihidroflavinele, prin 0/2, 0/4, N/3 și N/5 cu reactivii electrofili.

Riboflavina formează combinații chelat cu Ag (roșu), taliu (cristalizat) iar FMN formează combinații moleculare de adiție cu triptofanul, indolul, serotonina, cu unii fenoli, purine (adenina, cafeina), cu clortetraciclina etc. *(după Matilda Rosetti—Colțoiu, D. Oțeleanu, 1980).*

În utilizarea farmaceutică trebuie să se țină seama de solubilitatea mică a riboflavinei în apă (1 : 10.000); soluțiile saturate au un pH = 5,5 — 7,2. Solubilitatea în apă poate fi crescută prin adăugarea de hidroxizi alcalini diluați (care agravează, însă, descompunerea la lumină), acid boric, propilenglicol, extracte de ficat, uree; în prezența acidului ascorbic 20%, riboflavina la pH = 2,6 prezintă o creștere a solubilității de 4,5 ori față de apă; la pH = 6,3, solubilitatea scade, probabil prin formarea unui complex între cele două vitamine *(R. Hüttenrauch, 1965)*. La pH = 6,3, nicotinamida crește semnificativ solubilitatea riboflavinei iar triptofanul, la pH = 6,8 permite o solubilizare de 0,4 g%. Tamponul acid salicilic: fosfat disodic: salicilat de sodiu (0,35 : 0,9 : 7,6 g%), la pH = 4,5 — 5,5 oferă o solubilitate de 0,5 g% riboflavină și posibilitatea autoclavării.

Soluțiile injectabile tamponate la pH = 6 pierd 3,1% din activitate și la pH = 5 numai 1,2% din activitate, în 30 de zile, dar pierderile cresc prin încălzire la 100°C, cifrîndu-se la 0,25%/oră.

Riboflavina este incompatibilă cu substanțele cu reacție alcalină (descompunere), cu sărurile metalelor grele (precipitare), cu ionii de Ca^{2+} (inactivare). În colirele cu suflat de zinc apare, la

adăugarea soluției de riboflavină din fiole, un precipitat de fosfat de zinc (din fosfații folosiți în tamponarea soluției injectabile) și de aceea se impune filtrarea colfrului.

Riboflavina reduce acțiunea antibiotică a streptomicinei, eritromicinei, tirotricinei, carbomicinei etc. Vitamina B_2 accelerează, prin efectele fotosensibilizatoare în reacțiile de oxidare, degradarea clortetraciclinei, oxitetraciclinei și tetraciclinei, cu epimerizarea acestora la produși inactivi sau puțin activi. Astfel, de exemplu, riboflavina în asociere cu tetraciclina la pH = 4,5 (netamponat) produce o scădere a activității antibioticului proporțională cu timpul și anume: 21,2% după 1 oră; 30,3%, după 2 ore; 51,8% după 8 ore; 63,3% după 12 ore și 70% după 24 ore, timp în care soluțiile de tetraciclină nu arată modificări ale activității în absența riboflavinei. Prin adăugarea acidului ascorbic s-a redus degradarea tetraciclinei de la 18,6% la 8,4% *(J. Weidenhaimer și colab., 1969)*.

Este de remarcat că riboflavina interacționează cu diferite vitamine, scăzînd activitatea acidului folic, a ciancobalaminei și a tiaminei (care pare a fi protejată prin tiouree).

Riboflavin-fosfatul (Riboflavini-5'-phosphas natricum) reprezintă o formă *„solubilă"* a vitaminei B_2 (solubilitatea sa este de 1 : 20 în apă); soluția apoasă 1% are un pH de 4,5—6,3

1 g riboflavină corespunde la 1,37 g riboflavin-fosfat și astfel se poate prepara o soluție injectabilă cu un conținut de 0,5 g% de riboflavină din 0,64 g fosfat de riboflavină, 0,85 g clorură de sodiu, 0,06 g acid citric și apă ad 100 ml și care poate fi sterilizată prin autoclavare (sub pH 6,0) sau prin filtrare bacteriană, cînd se recomandă adăugarea de azotat fenilmercuric 0,005% sau de nipagin 0,10% *(V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Metode de dozare. Teste. Pentru dozarea vitaminei B_2 se folosesc **metodele fizico-chimice uzuale:** polarografia (potențialul de semiundă = −0,48 V); spectrofotometria (la 444, 267 sau 375 nm), fluorimetria (la 530 nm și pH 6,8—7). Cromatografia pe hîrtie de filtru, în strat subțire, pe coloană (schimbători de ioni) etc. permite determinarea separată a riboflavinei, FMN, FAD.

Dozarea în urină comportă acidifierea cu acid acetic, saturarea cu Na_2SO_3, extragerea cu piridină-butanol, tratarea cu $KMnO_4$ (pentru distrugerea substanțelor parazitare care interferează în reacție), îndepărtarea excesului de permanganat cu H_2O_2, transformarea în lumiflavină și determinarea fluorimetrică *(C. Scott, M. Hill, L. Norris, S. Heuser, 1946)*.

Metodele microbiologice urmăresc, în special pe *L. casei*, dezvoltarea (sensibilitate: 5 ng/ml) și respectiv cantitatea de acid lactic formată.

Testele biologice apreciază prevenirea sau vindecarea carenței la șobolan sau la puiul de găină.

Metodele biochimice determină fixarea O_2 pe enzimele flavinice.

O altă metodă, generală pentru vitaminele din grupa B cu rol de coenzime, constă în măsurarea activării enzimatice ce corespunde saturării *in vitro* cu coenzimă, utilizînd celule ușor de obținut, de exemplu eritrocite; cu cît o persoană este mai carențată în vitamină, sînt necesare cantități mai mari din vitamina respectivă pentru activarea (saturarea) sistemului enzimatic. În cazul vitaminei B_2, se utilizează „activarea enzimatică" *in vitro* a glutationreductazei din eritrocite, cu sau fără adaus de coenzimă FAD; la omul cu un aport de 0,3 mg vitamină B_2/1.000 calorii, apare, după 15—18 zile, un efect sensibil la activarea prin FAD (care denotă o stare de carență), în timp ce la aportul de 0,5 mg/1.000 calorii (și la cantități mai mari) se ajunge la un platou de activare inferior valorii de 25% (ceea ce denotă o stare de „saturare" relativă) *(D. Glatzle, N. F. Koenen, S. Christeller, O. Wiss, 1970; Y. Raoul, 1973)*.

În laboratorul clinic se determină vitamina liberă sau din sistemele enzimatice (din sînge); eliminarea urinară; „testul clinic" urmărește cedarea simptomelor carențiale; după administrarea a 10 mg riboflavină *per os*, dispare fotofobia și senzația de nisip în ochi, în 1—2 zile, în timp ce cheiloza cedează numai după 5—10 zile.

Unitatea internațională (U.I.) este reprezentată de 5 μg riboflavină cristalizată și corespunde cantității care asigură creșterea în greutate cu 1 g/zi a puiului de șobolan.

2.1.8.4. *METABOLISMUL VITAMINEI* B_2

Biosinteza vitaminei B_2 este realizată de către microorganismele flavinogene *(Eremothecium Ashbyii, Ashbya gossypii, Sacharomyces fragilis*, candida, clostridii, microbacterii, lactobacili), din precursori diferiți și pe căi diferite. *Ashbya gossipii* poate încorpora *carbonii:* din formiat în 4 a și 2; din HCO_3^- în 4; din glicocol în 4 a și 9 a; din acetil, C din carboxil în 4, 6, 7, 8 a și 10 a, iar cel din metil în 5, 8 și în metilii din 6 și 7; C_1 și C_6 din glucoză se încorporează similar cu C din metilul acetilului. Alături de acești precursori se cu-

Scanned with OKEN Scanner

nosc şi alţii, de exemplu, formarea din treonină sau serină şi ribitilxantină; din adenină, guanină (partea ce corespunde pirimidinei). În prezent se acordă credit unei ipoteze care susţine ca precursori, respectiv ca intermediari, derivaţi ai *lumazinei* (compusul G şi V) în prezenţa şi chiar în absenţa compuşilor „C_4-dicarboxilici" *(fig. 2.46)* *(T. Goodwin, B. G. Audley, O. T. G. Jones şi colab., 1956—1962; A. C. Wilson, A. B. Pardee, 1962; H. Wacker şi colab., 1964)*.

Absorbţia se face la nivelul intestinului subţire, unde are loc şi o fosforilare, dovedită prin constatarea că inhibitorii fosforilării şi respectiv corticosuprarenalectomia scad gradul difuziei. În organism se găseşte sub formă liberă în lichide (plasmă, urină, lapte) şi retină şi sub formă legată (FMN, FAD, enzime flavinice) în celule şi ţesuturi.

Sîngele uman conţine aproximativ 3 μg riboflavină/100 ml, din care 0,84 ± ± 0,71 liberă şi 2,32 ± 0,42 legată. Dozarea riboflavinei din *eritrocite* este un indicator util deoarece reflectă destul de fidel aportul alimentar; după ingerarea a 0,5 mg vitamină B_2/zi se înregistrează 10—13 μg/100 ml globule roşii, iar după 2,5—3,5 mg/zi, valorile se dublează (20—27 μg/100 ml).

Ficatul uman conţine 25—33 μg/g; conţinutul hepatic scade proporţional cu avansarea în vîrstă (la bătrîni) şi cu gradul de carenţare (1,15 μg/g).

O înregistrare a distribuţiei riboflavinei la om dă următoarele valori: sînge total (49—304), ser (20—37), eritrocite (180—262), leucocite (2,27—2,93 μg/litru); rinichi (20), ficat (16), inimă (8,3 μg/g).

Excreţia urinară, raportată la volum, variază mult în decursul zilei şi reprezintă aproximativ 30% din vitamina ingerată: o excreţie de 20—30 μg/oră *(à jeun)* indică o stare normală, iar valorile sub 10 μg/oră sugerează stări de carenţă *(Sinclair, 1948)*. Valori mai constante se obţin prin raportarea la creatină (element mai puţin variabil). Excreţia la copii este, proporţional, mai mare ca la adult. Alte căi de eliminare sînt sudoarea (10 μg/oră), fecalele (cantităţi mari, provenite din biosinteza florei intestinale şi respectiv din partea neabsorbită), laptele.

2.1.8.5. *ROL BIOCHIMIC. INTERRELAŢII VITAMINICE*

Activarea riboflavinei necesită fosforilarea sa prin ATP, în prezenţa flavokinazei şi Mg^{2+} la *FMN*; acesta poate lega, în continuare acidul adenilic dintr-o altă moleculă de ATP, sub influenţa flavinadenin-pirofosfatazei şi Mg^{2+} cu formarea *FAD*. Prima reacţie are loc în mucoasa intestinului subţire (servind pentru absorbţie) şi, ambele, în ficat, rinichi şi alte ţesuturi, unde aceste coenzime se leagă de proteine formînd *enzimele flavinice*, implicate într-o varietate de reacţii metabolice *(fig. 2.47)*. Dintre enzimele care au cofactor *FMN* fac parte: L-lactat-DH, NADPH-oxidoreductaza, lactatoxidaza, flavodoxinele; dintre cele cu *FAD*: lipoamid-DH, glutationreductaza, D-aminoacid-oxidaza, D-glucozo-oxidaza, salicilat-hidroxilaza, orcinol-hidroxilaza; cu *FAD, Fe*: succinat-DH, NADH—DH; cu *FAD, Fe, Mo*: xantinoxidaza (cu —DH s-a prescurtat „-dehidrogenază") *(după F. Korte, M. Goto, 1977)*.

În felul acesta, enzimele flavinice şi respectiv riboflavina şi coenzimele participă în reacţii esenţiale pentru metabolismele intermediare ale glucidelor, lipidelor, proteinelor (aminoacizilor), în exercitarea efectelor unor oligometale (Fe, Mo, Cu etc., sub forma unor combinaţii definite, active enzimatic), în

Scanned with OKEN Scanner

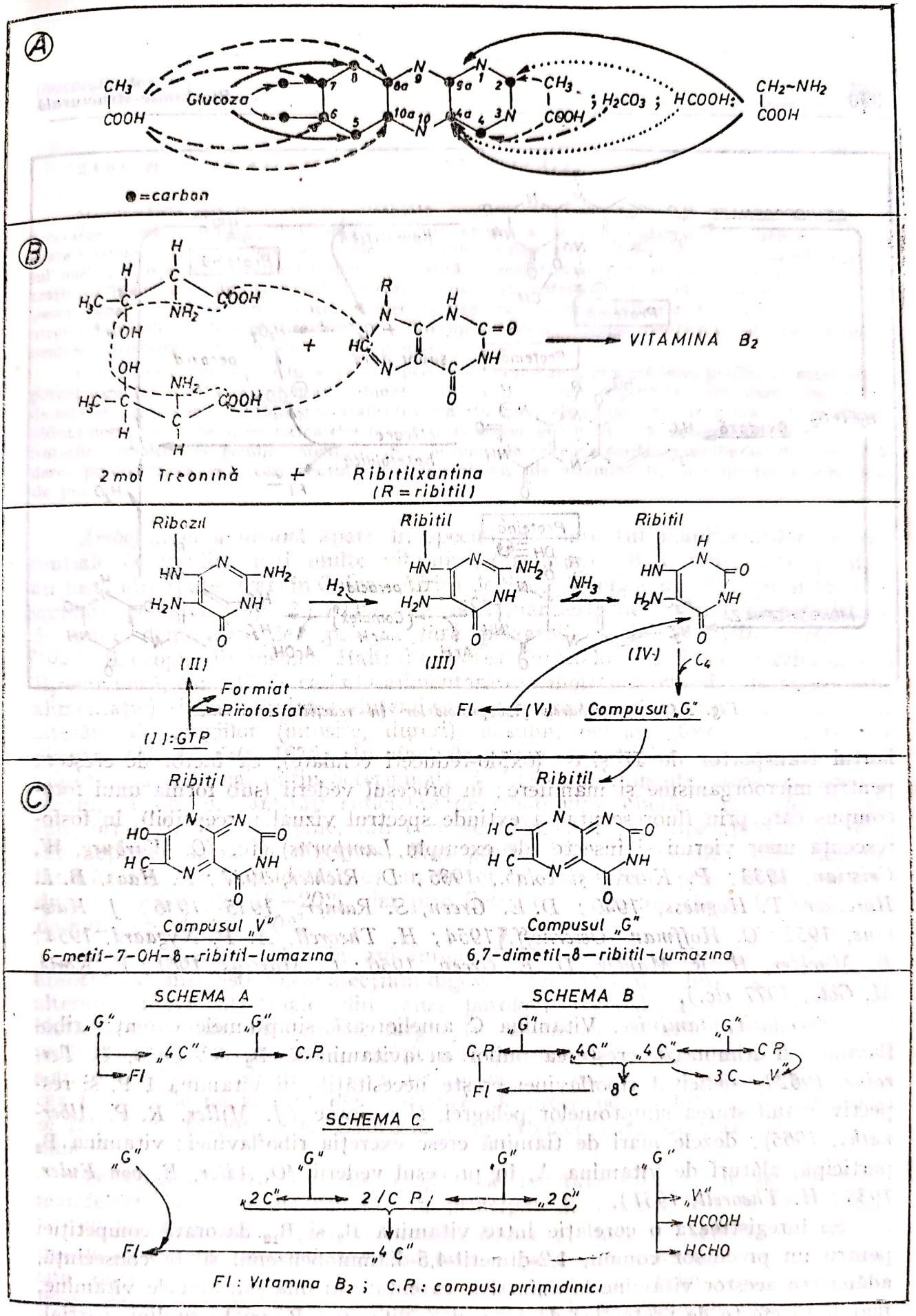


Fig. 2.46. Scheme pentru biosinteza vitaminei B_2 pe diferite căi : A. Proveniența atomilor de C din molecula vitaminei B_2. B. Biosinteza din treonină și ribitilxantină C. Biosinteza la microorganismele flavinogene. GTP (I) pierde C_8 prin ciclohidrolază și ribozilul se transformă în ribitil (rearanjare Amadori și reducere), apoi are loc hidroliza grupării 2-NH_2 și incorporarea unității „4 C", cu formarea compusului „G"; acesta prin schemele A, B, C și cu participarea flavinsintetazei, conduce final la Fl (vitamina B_2).

Scanned with OKEN Scanner

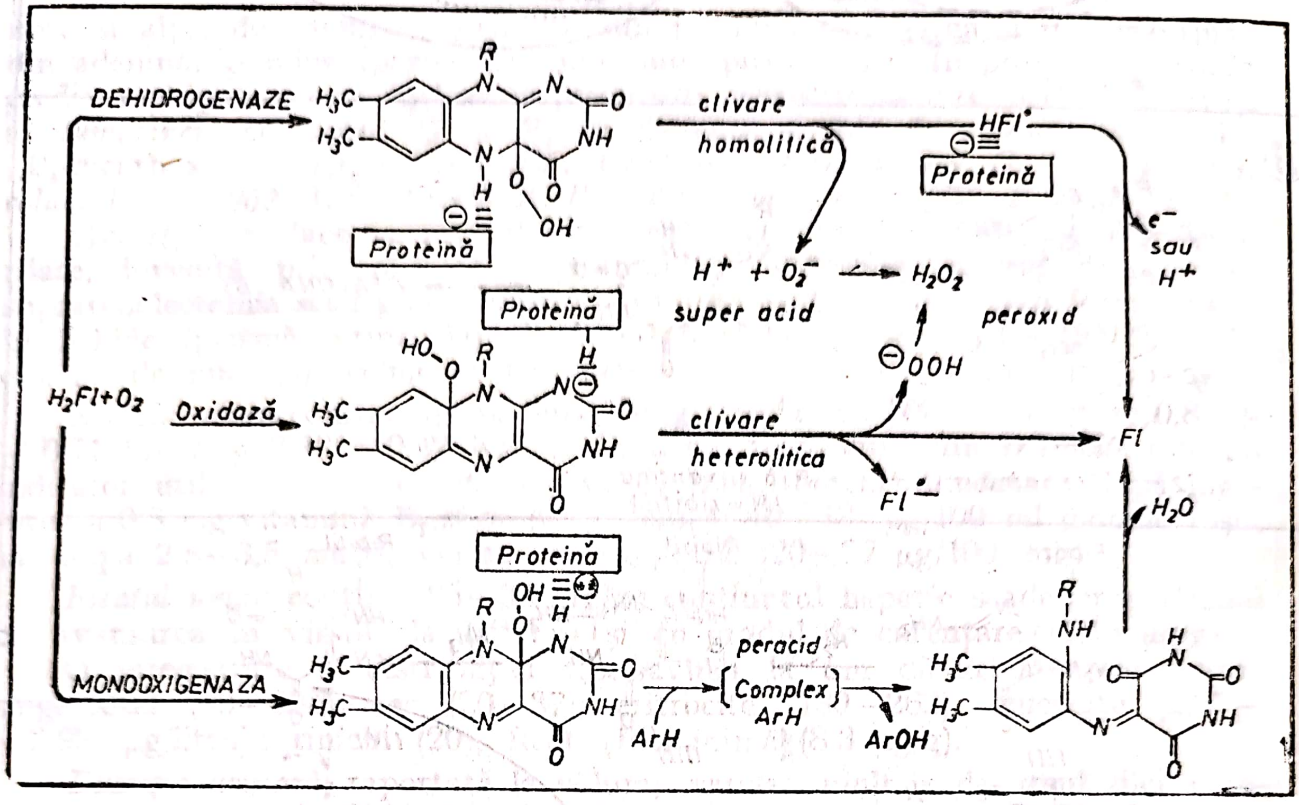


Fig. 2.47. Participarea flavoproteidelor în reacțiile enzimatice

lanțul transportor de H și e^- (oxido-reduceri celulare), ca factor de creștere pentru microorganisme și mamifere; în procesul vederii (sub forma unui fotocompus care prin fluorescența sa extinde spectrul vizual perceptibil), în fosforescența unor viermi și insecte (de exemplu, *Lampyrus*) etc. *(O. Warburg, W. Cristian, 1933; P. Karrer și colab., 1935; D. Richter, 1937; E. Haas, B. L. Horecker, T. Hogness, 1940; D. E. Green, S. Ratner, 1945—1946; J. Hawkins, 1952; O. Hoffman—Osterhoff, 1954; H. Theorell, A. P. Nygaard, 1954; B. Mackler, H. R. Mahler, D. E. Green, 1956; C. Martius, 1961; F. Korte, M. Goto, 1977 etc.).*

Interrelații vitaminice. Vitamina C ameliorează simptomele carenței riboflavinice și stimulează creșterea puilor cu avitaminoză B_2 *(C. Calet, T. Terroine, 1962);* deficitul riboflavinei crește necesitățile în vitamină P.P. și respectiv manifestarea simptomelor pelagrei, și reciproc *(J. Miller, R. P. Albernathy, 1965);* dozele mari de tiamină cresc excreția riboflavinei; vitamina B_2 participă, alături de vitamina A, în procesul vederii *(O. Adler, E. von Euler, 1938; H. Theorell, 1951).*

Se înregistrează o corelație între vitamina B_2 și B_{12} datorată competiției pentru un precursor comun, 1,2-dimetil-4,5-diaminobenzenul și, în consecință, adăugarea acestor vitamine la animalele carențate în una sau ambele vitamine, manifestă efecte de protecție; de asemenea, vitamina B_2 poate suplini, parțial, vitamina B_{12} de exemplu în creșterea puiului de găină.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.8.6. *HIPO- ŞI AVITAMINOZA B_2. NECESITĂŢI*

Manifestările *ariboflavinozei* experimentale variază cu specia. La şobolanul tînăr se constată încetarea creşterii (0,1 mg riboflavină/zi asigură creşterea cu aproximativ 7—10 g/săptămînă); la toate vîrstele se observă alopecia, cu căderea părului şi dermatite eritemoscuamoase (iniţial la nivelul nărilor şi ochilor); afecţiuni oculare: blefarită, vascularizarea corneei (semn relevant), cu infiltraţii ale limbului ce duc la opacifierea corneei, ulceraţii, cataracte; tulburări sanguine: leucopenie (semn precoce); scăderea rezistenţei la infecţii; steatoză hepatică; tulburări nervoase şi endocrine: atrofia testiculului, leziuni tiroidiene şi ale suprarenalelor. Cîinele manifestă tulburări cutanate, oculare, degenerescenţă musculară şi anemie.

Carenţa vitaminei B_2 are importante repercusiuni economice, prin scăderea producţiei animaliere; porcul carenţat manifestă tulburări cutanate, oculare, hipotonie, degenerări musculare, lipsa poftei de mîncare, scăderea fertilităţii şi mortalitatea ridicată a purceilor; la puiul de găină se înregistrează leziuni nervoase cu paralizia picioarelor (greutate la mers), şi o încetare a creşterii, dar lipsesc manifestările dermice; la găinile carenţate apar leziuni ale nervilor periferici, tulburări de mers, scăderea producţiei de ouă (care conţin cantităţi mai mici de vitamină B_2) şi respectiv a numărului de pui.

Ariboflavinoza umană apare în special în contextul manifestărilor policarenţiale ce implică mai multe vitamine din grupul B. Carenţe mai specifice au fost observate (rar) în China, Africa de Sud, America de Sud, cu simptome similare pelagrei *(cap. 2.1.10.6)*, dar fără manifestările dermice caracteristice, de unde denumirea de „pelagra fără pelagră" *(L. W. Mc. Elroy, H. Goss, 1940)*. La copiii din insulele Haiti din Marea Caraibilor s-a descris o avitaminoză B_2 endemică, cauzată de carenţa alimentară din motive economice (sărăcie, subalimentaţie) şi/sau religioase (interzicerea consumului cărnii unor animale), cu alterări ale gingiilor (înroşire, dureri), nasului, ochilor (fotofobie), dureri în picioare *(H. A. Ketz, 1976)*. În afară de aceste excepţii, avitaminoza B_2 naturală umană este mai puţin determinată de lipsa din alimente, deoarece acestea conţin, de obicei, cantităţi suficiente de riboflavină liberă şi mai ales legată, sub formă de flavoproteine, din care se eliberează prin operaţiile culinare şi sub acţiunea sucurilor digestive. Sînt posibile şi mari pierderi din alimente, fiindcă, deşi este considerată ca un factor „termostabil", prin fierbere se produce o pierdere de 15—20%, iar prin fierberea la lumină chiar de 50%; prin deshidratare de 20—50%.

Între cauzele reale ale avitaminozei B_2 umane se înscriu: deficitul de absorbţie ce însoţeşte unele afecţiuni digestive (enterocolite; hipo- şi aclorhidrii; alterarea florei intestinale, din cauze patologice sau după consumul de antibiotice, sulfamide, cu spectru larg). În asemenea situaţii apar, uzual, stări policarenţiale, în a căror componenţă intră ariboflavinoza. Informaţii mai precise s-au obţinut pe voluntari carenţaţi numai în vitamina B_2, dar nici în acest caz tulburările nu sînt absolut specifice, deoarece pe fondul lipsei riboflavinei se instalează tulburări de absorbţie şi metabolice care afectează şi alte vitamine.

Pe baza observaţiilor clinice şi experimentale s-au putut stabili cîteva manifestări ca fiind determinate în principal de carenţa riboflavinei la om.

Tulburări la nivelul gurii şi tractului digestiv: cheilita (cheilosis) comisurilor bucale cu eriteme, descuamare moderată, ragade dureroase, „perleşul" (stomatita angulară sau „zăbăluţe") care ar fi datorate infecţiilor secundare (stafilococ hemolitic, monillia) şi lipsei de fier (anemie hipocromă), pe fondul carenţei vitaminei B_2. Leziunile se extind în interiorul gurii, cu congestia mucoasei buco-

Scanned with OKEN Scanner

faringiene, limbă netedă, roşie, dureroasă (limba magenta, glosodinia, semn precoce al carenţei), care produc dificultăţi în alimentare; aclorhidrie gastrică.

Leziunile dermice, cu leziuni umede ale pielii, care se manifestă ca „dermatită seboreică eritematoasă uşor descuamată" pe faţă, aripile nasului, frunte, ceafă, scrot, tegumente perianale, căderea părului etc.

Tulburările oculare sînt cele mai importante şi caracteristice: oboseală vizuală, fotofobie, senzaţie de „nisip în ochi", scăderea acuităţii vizuale şi cecitatea (orbirea) la zăpadă, care pare a se datora distrugerii vitaminei B_2 din retină sub efectul U.V. (prin reverberarea puternică a luminii pe zăpadă). În continuare, dermite ale pleoapelor, cu mîncărimi, arsuri; blefarospasm; vascularizarea exagerată a conjunctivei („pseudoconjunctivite") şi a corneei (proliferarea limbului şi bucle capilare), care duc la opacifierea corneei şi cataracte.

Alte simptome ale carenţei: afectarea sistemului nervos, cu astenie, pareze, tulburări ale reflexelor, nistagmus, ataxia membrelor inferioare, tremurături etc. Avînd în vedere rolul enzimelor flavinice, în carenţa vitaminei B_2, se înregistrează leziuni metabolice, ca de exemplu în metabolismul triptofanului, cu consecinţe directe în scăderea biosintezei endogene a vitaminei P.P. (de aici simptomele de pelagră ce se suprapun în avitaminaza B_2 naturală); de asemenea în căile metabolice ale altor aminoacizi, glucide, lipide, în oxido-reducerile celulare etc.

Necesităţile adultului se apreciază la 1,5—1,8 mg/zi, ale sugarului la 0,6 mg/zi; în perioada de creştere, pubertate, în munci grele şi la gravide cresc la 2,5 mg/zi, iar în alăptare, chiar la 6 mg/zi. Aceste necesităţi sînt acoperite prin regimul alimentar normal, care oferă cantităţi suficiente de vitamină B_2 şi prin flora intestinală flavinogenă, *(B. mesenteroides, B. faecalis alcalinigens, E. coli* etc.) *(L. W. Kc. Elroy, I. H. Goss, 1940; F. Bicknell, F. Prescott, 1953; Martin, D. W. şi colab., 1983).*

În caz de avitaminoză B_2, la administrarea preparatelor cu riboflavină, întîi cedează fotofobia şi senzaţia de „nisip în ochi" (după 1—2 zile), apoi dermatita feţei şi leziunile bucale (peste 3 zile), dar vindecarea completă necesită un timp mai lung (1—2 luni).

2.1.8.7. *INDICAŢII TERAPEUTICE. HIPERVITAMINOZA*

Preparatele de vitamină B_2 singure şi/sau în asociere cu alte vitamine sînt utilizate în stările policarenţiale, în tulburările dermice: dermite seboreice, eczeme infantile, prurigo, ragade, lupus eritematos şi ale gurii: keiloză, stomatite; în afecţiunile oculare: fotofobie, hemeralopie şi alte tulburări de acomodare vizuală: blefarospasm, conjunctivite, keratite, hemoragii retiniene; în enterocolitele cronice, sindromul de malabsorbţie, sprue, anemie; insuficienţe hepatice; afecţiuni alergice, astmul bronşic, în cursul terapiei cu antibiotice cu spectru larg (tetracicline, cloramfenicol) etc.

Riboflavin-monofosfatul (FMN) în inj.i.m. profunde se recomandă profilactic şi curativ (2—15 mg/zi) în ariboflavinoze, stări policarenţiale B (hemeralopie, conjunctivite, keiloză, stomatită angulară, acneea rosacee, crampe musculare) şi pentru stimularea creşterii (0,5 mg/zi la copiii sub 2 ani şi 10 mg, peste 15 ani).

Hipervitaminoză. Vitamina B_2 nu prezintă efecte toxice: cîinele şi şobolanul tolerează 2 g/kg greut. corp. DL_{50} este de peste 20 g/kg greut. corp. *per os.* La *om*, dozele mari (30 mg/zi), repetate des şi pe perioade mai îndelungate, pot cauza unele simptome ce se atribuie hipervitaminozei: crampe musculare nocturne ale gambelor şi poliurie, concomitent cu afectarea utilizării şi metabolismului altor vitamine, prin competiţie pentru procesele enzimatice de fosforilare.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.9. PIRIDOXINA. VITAMINA B_6. ADERMINA. VITAMINA ANTIPELAGROASĂ A ȘOBOLANULUI

Dermatita carențială a extremităților șobolanului albinos denumită *„acrodinie"* sau *„pelagra șobolanului"* *(Goldberger, Lillie, 1926)*, considerată analoagă pelagrei umane, a fost delimitată de aceasta *(T. W. Birch, P. György, L. Harris, 1934—1935)* și de dermatita puilor de găină *(C. A. Elvehjem, C. J. Koehn, 1935)* și s-au înregistrat simptomele carențiale la copii *(S. E. Snyderman și colab., 1953; J. W. Harris și colab., 1956)*. Carența a fost atribuită unui factor din grupul B, adsorbit pe argilă și care a fost izolat în stare pură *(S. Lepkovsky, 1938; R. Kuhn, 1938)* atribuindu-i-se denumiri diferite: „factor acrodinic al șobolanului", „factor antidermatitic al șobolanului", „vitamina antipelagroasă a șobolanului", „factor eluat al drojdiei", vitamina B_6; acești factori au fost identificați cu *piridoxina*, căreia i s-a stabilit structura chimică *(R. Kuhn, G. Wendt, 1938; P. György, R. E. Eckardt, 1939)* și care a fost obținută prin sinteză *(S. Harris, K. Folkers, 1939)* și s-au elucidat formele interconvertibile metabolic (piridoxol, piridoxal, piridoxamină) și rolul lor de coenzime *(E. Snell, 1942, 1944, 1955; T. W. Birch, P. György, 1936)*.

2.1.9.1. *STRUCTURĂ. PREPARARE*

Vitamina B_6 naturală este alcătuită dintr-o „triadă" de derivați ai piridinei, care diferă între ei prin R din poziția 4 și anume: *piridoxină sau piridoxol*, cu $R = -CH_2OH$ (alcool), predominantă în vegetale; *piridoxal* (PAL) cu $R = -CHO$ (aldehidă) și *piridoxamină*, cu $R = -CH_2NH_2$ (amină), care predomină la animale. Ele se transformă, reciproc, unele în altele, în cursul proceselor metabolice și joacă rolul de coenzime a unor sisteme enzimatice sub formă fosforilată în poziția 5, denumite PALPO, prescurtare de la „**Pi**ridox**AL**-**Ph**O**s**phate" *(fig. 2.48)*.

Vitamina B_6 a fost izolată în stare cristalizată, inițial, din coji de orez și din drojdie, prin adsorbție pe argilă, eluție cu barită și precipitare cu acid fosfotungstic.

Prin sinteză s-a obținut din condensarea α-acetil-α'-etoxi-acetonei ($H_3C—CO—CH_2—CO—CH_2—O—C_2H_5$) cu cianoacetamidă ($H_2N—CO—CH_2—CN$) în prezența piperidinei drept catalizator; pe derivatul piridinic format se introduc substituenții caracteristici vitaminei B_6 *(S. A. Harris, K. Folkers, 1939)*, precum și prin alte metode, care pleacă de la piridină sau derivații săi, cu aplicații industriale.

Derivații vitaminei B_6 pot fi convertiți în compușii 5'-fosforilați activi (PALPO), cu amestec de acid fosforic (85%) și pentoxid de fosfor, după protejarea substituentului din C/4, dacă este necesar *(M. Viscontinni, C. Ebnother, P. Karrer, 1951; A. N. Wilson, S. A. Harris, 1951; F. Korte, M. Goto, 1977)*.

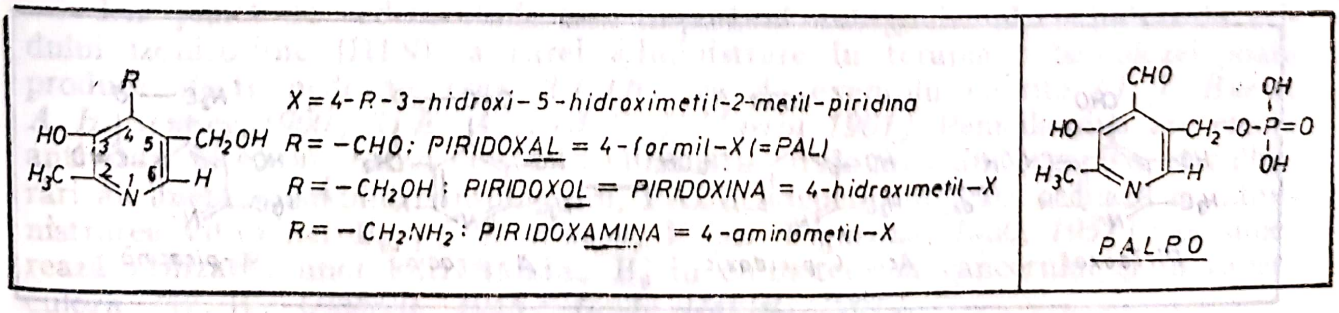


Fig. 2.48. Structura vitaminelor B_6 și a piridoxalfosfatului (PALPO)

Scanned with OKEN Scanner

2.1.9.2. *RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINE*

Transformarea în cadrul „triadei B_6" se poate realiza ușor *in vitro*:

$$\text{PIRIDOXOL} \xrightarrow[(KCr_2O_7;\ KMnO_4\ \text{etc.})]{\text{oxidare}} \text{PIRIDOXAL} \xrightarrow[(NH_3)]{\text{aminare}} \text{PIRIDOXAMINA}$$

In vivo are loc transformarea piridoxalului în piridoxamină pe seama grupărilor $-NH_2$ ale unui aminoacid (oarecare) care se transformă în cetoacidul corespunzător, și invers:

PIRIDOXAL + ACID GLUTAMIC ⇌ PIRIDOXAMINA + ACID α-OXO-GLUTARIC

Prin asemenea reacții, sub formă de chelați și, în special, sub formă de sisteme enzimatice cu PALPO (transaminaze), vitamina B_6 participă în procese metabolice esențiale pentru organisme.

Datorită transformării reversibile a R din poziția 4, piridoxolul, piridoxalul și piridoxamina sînt considerate ca forme echivalente enzimatic.

Acidul-4-piridoxic și în special lactona sa β-*piracina* și respectiv lactona acidului 5-piridoxic, α-*piracina* *(fig. 2.49)* par a fi implicate în eritropoieză, cu efecte antianemice.

Unii esteri, de exemplu, diacetatul sau tetraacetatul piridoxinei manifestă activitate pe șobolan, bacterii, levuri, fungi, dar alte înlocuiri în molecula vitaminei B_6 conduc la analogi structurali antagoniști, la care se adaugă și alți compuși care au efecte de antivitamine B_6 *(fig. 2.50)*, de exemplu:

Analogi structurali: 5-deoxipiridoxal; 4-deoxipiridoxina; 2-metil-4-amino-5-oximetil-pirimidina (toxopirimidina); acidul 4-piridoxolic, 4-dezoxipiridoxin-fosfatul; toxopirimidin-fosfatul; acidul 4-piridoxil-fosfat.

Reactivii carbonilici și *produșii lor de condensare* cu vitaminele B_6 și respectiv cu PALPO, ca de exemplu, hidrazida, semicarbazida, hidroxilamina, hidrazida acidului izonicotinic (HIN), piridoxaloxima, piridoxalsemicarbazona, PALPO-oxima, PALPO-HIN *(cap. 2.1.9.6)*.

Inhibitorii substrat-analogi ca L—, DL—, sau D-cicloserina; izooxazolidona, cicloalanina.

Inhibitori conformaționali: izomerii cicloglutamatului *(E. E. Snell, 1961; J. M. Ostrowski și colab., 1973)*.

Antivitaminele B_6 produc, în general, crize epileptiforme care pot duce la moartea animalelor și inhibă creșterea microorganismelor vitamin B_6-dependente.

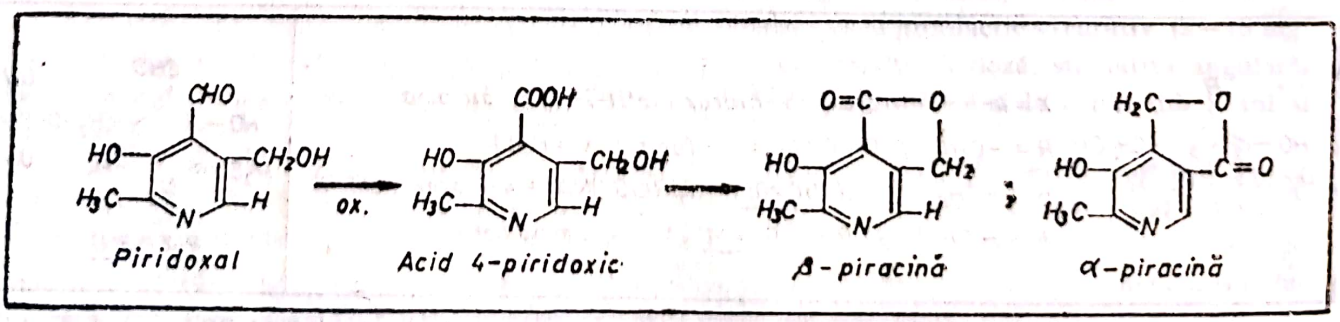


Fig. 2.49. Oxidarea piridoxolului la acid 4-piridoxic și lactonizarea acestuia la β-piracină

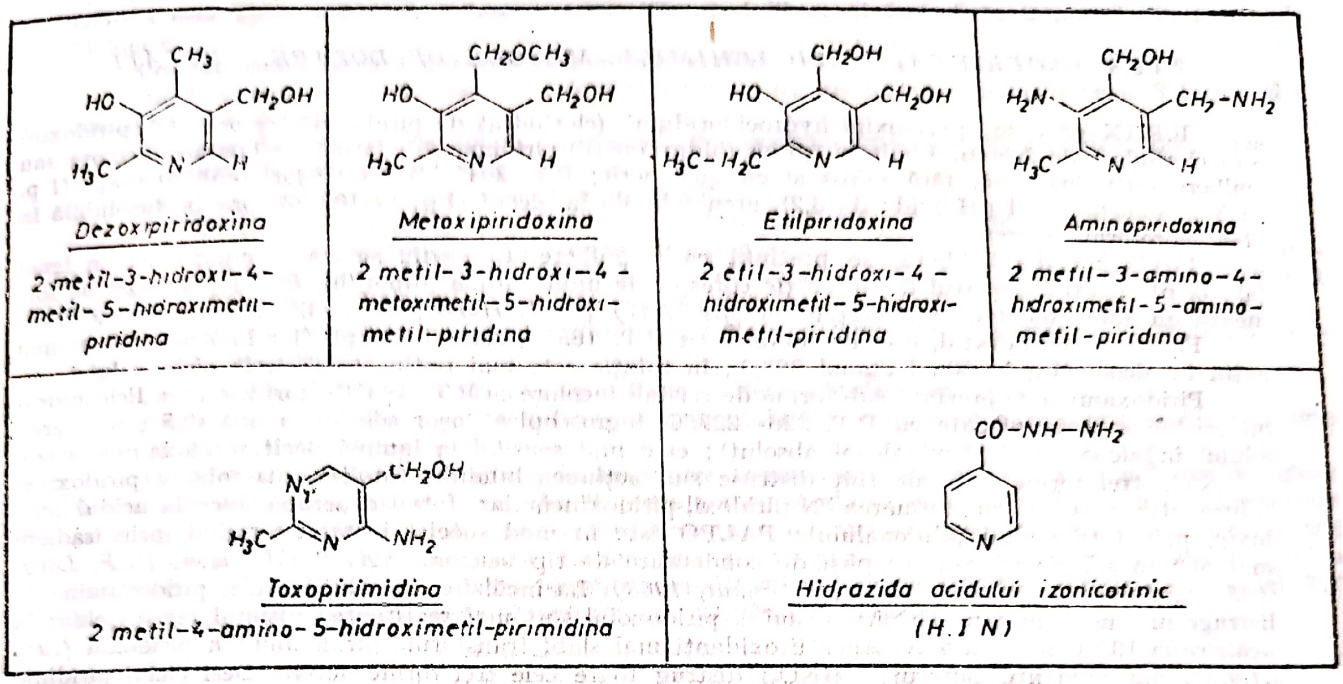


Fig. 2.50. Antivitamine B_6

Dezoxipiridoxina manifestă efectul de antivitamină B_6 la pui, în raport de 2 mol./1 mol. vitamină; dezoxi-PALPO este inhibitor al sistemelor enzimatice cu PALPO. Metoxipiridina este antivitamină pentru pui în raport de 4 mol./1 mol. vitamină B_6 și mai puțin pentru șobolan. Etilpiridoxina, aminopiridoxina, sînt antagoniști pentru *Sacharomyces*, *E. coli*, șoarece.

Interesantă este acțiunea toxopiridoxinei, care se formează prin scindarea tiaminei *(B. Alexander, G. Landwehr, F. Mitchell, 1946; T. Suhara, I. Nabuco, 1962)*. Administrarea parenterală provoacă la animale crize epileptiforme, care se agravează mult la animalele carențate concomitent în vitamină B_6; manifestă efecte inhibitoare asupra unor enzime cu PALPO, ca de exemplu, glutamat-decarboxilaza din creier, alanin- și aspartat-transaminaza din celulele animale și bacteriene și a piridoxalkinazei. Mecanismul de antagonizare se explică prin capacitatea sa de a se fosforila, formînd toxopirimidinfosfatul, care intră în competiție cu PALPO pentru enzimele piridoxalice *(K. Makino, M. Koiko, 1954)*.

Reactivii carbonilici se combină spontan cu piridoxalul sau PALPO formînd hidrazone care acționează inhibitor asupra piridoxalkinazei și altor enzime din metabolismul piridoxalului.

Din punct de vedere clinic este important antagonismul cu hidrazida acidului izonicotinic (HIN), a cărei administrare în terapia tuberculozei poate produce efecte nedorite *(cap. 2.1.9.6)*, ca de exemplu nevrite *(J. J. Burns, A. H. Conney, 1960; A. E. Axelrod, C. J. Martin, 1961)*. Penicilamina are efecte antivitaminice, provocînd creșterea eliminării piridoxinei din organism și tulburări ale metabolismului triptofanului, PALPO-dependent, care cedează la administrarea vitaminei B_6 *(J. J. Wilson, V. du Vigneaud, 1950, 1957)*; se sugerează utilizarea unor antivitamine B_6 în chimoterapia cancerului și în tuberculoză *(W. W. Umbreit, 1955; L. J. Daniel, 1961)*.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.9.3. PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE. UNITĂȚI

F.R.IX prevede „pyridoxini hydrochloridum" (clorhidrat de piridoxină, respectiv de piridoxol) sau clorhidrat de 2-metil-3-hidroxi-4,5-bis-(hidroximetil)-piridina, sub formă de cristale incolore sau pulbere cristalină albă, fără miros și cu gust acru; P.T. 204°—210°C; ușor solubilă în apă (1 p. în 5 p, soluția avînd pH acid: 3—3,2), greu solubilă în alcool (1 p. în 100 p.), practic insolubilă în eter, cloroform, benzen.

Piridoxina (bază liberă) se prezintă ca o pulbere. În mediu acid se comportă ca un fenol (a); la pH neutru, spectrul de absorbție corespunde unui amfion (dipol)(b), iar la pH bazic se formează un anion fenolat cu N terțiar (c) *(fig. 2.51) (S. A. Harris, T. J. Webb, K. Folkers, 1940)*

Piridoxal-clorhidratul, cristale rombice cu P.T. 165°C, solubil în apă (1 g în 2 ml apă) și mai puțin în alcool (1 g în 60 ml etanol 96%); în soluție este mai puțin stabil decît piridoxalul.

Piridoxamina se prezintă sub formă de cristale incolore cu P.T. 193°C; piridoxamin-diclorhidratul cristalizează în plăcuțe cu P.T. 226—227°C, higroscopice; ușor solubil în apă (0,5 g/ml), greu solubil în alcool (1 g/155 ml alcool absolut); este mai sensibil la lumină decît piridoxamina bază.

Cele trei forme naturale sînt distruse sub acțiunea luminii; fotoliza anaerobă a piridoxinei induce dimerizarea, cu formarea N-piridoxil-piridoxinei, iar fotoliza aerobă duce la acidul piridoxic, prin intermediul piridoxalului; PALPO este în mod special instabil formînd, prin iradiere anaerobă în soluție apoasă compuși de condensare de tip benzoine *(A. L. Morrison, R. F. Long, 1958; S. Ikeda, T. Oka, N. Ohishi, S. Fukui, 1968)*. La încălzire, în soluții acide, piridoxamina se distruge mai ușor, în timp ce piridoxalul și piridoxolul sînt mai rezistente; ultimul rezistă chiar la încălzire la 100°C în acizi 5 N. Agenții oxidanți mai slabi transformă piridoxolul în piridoxal *(cap. 2.1.9.2)*, dar oxidanții puternici (HNO_3) distrug toate cele trei forme active. Deși ciclul piridinic este foarte stabil chimic, el poate să fie degradat enzimatic de unele bacterii *(E. Snell și colab., 1969)*. Cu acidul boric se obține un complex în care piridoxolul este angajat prin OH din pozițiile 3 și 4 și care păstrează activitatea.

Prin prelucrarea alimentelor se pierd mari cantități de vitamină B_6, de exemplu prin fierberea sau frigerea cărnii (50%), în conservele de legume (77%), în prelucrarea cerealelor și respectiv în obținerea făinii foarte fine (50—93%), în preparatele de lapte (36—70%).

În *domeniul farmaceutic* se utilizează *Pyridoxini hydrocloridum* (F.R.IX); soluțiile suportă autoclavarea, dar sînt sensibile la lumină.

Prezintă *incompatibilități* cu substanțele alcaline (la pH peste 5,0 soluțiile se colorează) și cu oxidanții (inactivare). Dintre *interacțiunile* de interes farmaceutic și/sau terapeutic se pot menționa: creșterea eliminării furantoinei (aproape la dublu); reducerea sau anihilarea acțiunii antiparkinsoniene a L—DOPA (prin activarea DOPA-oxidazei din țesutul nervos); influențează soluțiile de pantotenat de calciu, datorită domeniilor pH-ului de stabilitate diferite (să se evite asemenea asocieri); în asocierea piridoxinei cu tiamina-HCl și hidroxicobalamina (0,02 : 0,02 : 0,0005 g/ml) la pH = 4,3 are loc degradarea cu viteze diferite a vitaminelor componente, cea mai afectată fiind B_1 (93%) și apoi B_{12} (58%) *(a se vedea și cap. 2.1.9.5) (V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*

Pentru *identificare și dozare* se aplică metode diferite.

Metode fizico-chimice: — absorbția maximă la 291 nm în U.V.: (soluție 0,001 g% în HCl, 0,1 N) și la 254 și 324 (soluție 0,002 g% în tampon pH, 7: F.R.IX).

Cromatografia pe hîrtie de filtru cu propanol — acid formic, urmată de eluție, permite separarea formelor libere de cele fosforilate:

Cromatografia pe schimbăitori de ioni, urmată de oxidarea cu $KMnO_4$ în mediu acid, la cald, conduce la acidul piridoxic (piridoxoic) și apoi la o lactonă care poate fi determinată fluorimetric;

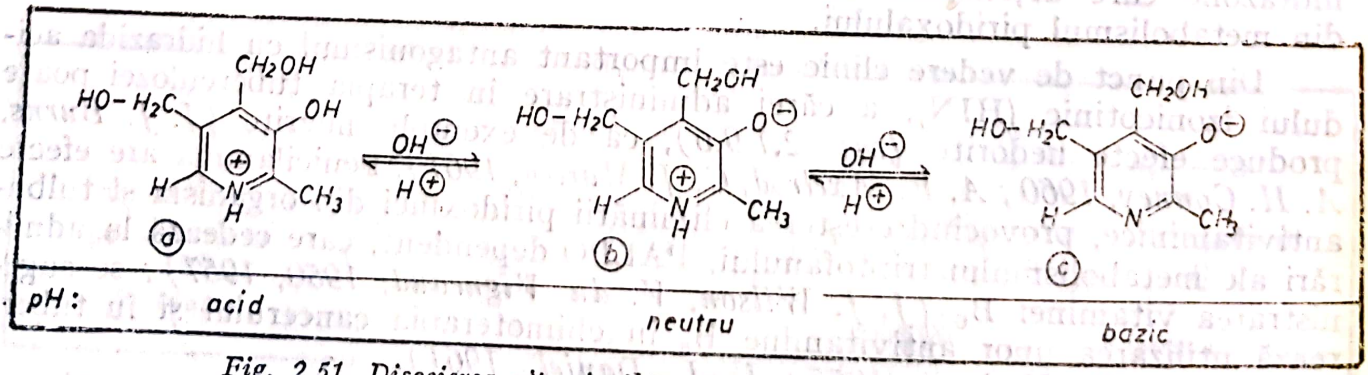


Fig. 2.51. Disocierea vitaminei B_6 în dependență de pH-ul mediului

metoda este aplicabilă pentru determinarea vitaminei libere și fosforilate (separat) din produsele biologice.

Cromatografia în fază gazoasă (gaz-cromatografia).

Electroforeza pe hîrtie sau în coloană permite, de asemenea, separarea celor 3 forme și a esterilor lor fosforici.

Metodele fluorimetrice se aplică, în special, pe produșii separați prin metodele anterioare.

Reacțiile de culoare sînt larg aplicate.

Cu $FeCl_3$: colorație roșie (reacție nespecifică);

Cu reactivul *Folin-Denis* (ac. fosfotungstic/fosfomolibdic): colorație albastră;

În mod similar, datorită —OH fenolic reacționează cu *diazometan;* după încălzire cu cloroform în KOH 20% în prezență de alcool apare o colorație violetă, cu absorbție maximă la 599 și 555 nm (*reacția Kuhn-Löw*, una din cele mai sensibile);

Cu *derivații diazoici ai acidului sulfanilic, p-aminoacetofenonei sau p-nitranilinei* se obțin compuși colorimetrabili;

Cu 2,6-diclorchinonclorimida *(reacția Gibbs);* sensibilitate: 0,5 μg/ml.

Toate aceste metode necesită îndepărtarea prealabilă a compușilor care interferează în reacție prezenți în mediile biologice.

Metodele de apreciere a *creșterii Sacharomyces (cerevisiae* sau *Carlsbergensis)* și **microbiologice:** *Streptobact. plantarum, Streptoc. faecalis R.*, care apreciază global vitaminele B_6; pentru diferențiere se poate folosi o metodă combinată: *Neurospora sitophila*, pentru determinarea totalului celor trei forme; *mutantul X:* pentru piridoxol; *Lactob. casei* numai pentru piridoxal și *Streptoc. faecalis*, pentru piridoxal și piridoxamină. La baza acestor metode stă activitatea relativă diferită a „triadei B_6" ilustrată mai jos *(după Matilda Rosetti-Colțoiu, D. Oțeleanu, 1980):*

Derivat B_6	*Streptococcus faecalis*	*Lactobacillus casei*	*Sacharomyces Carlsbergensis*	*Neurospora sitophila*
Piridoxol*	1,0	1,0	1,0	1,0
Piridoxamina	6.500	8,2	1,1	1,1
Piridoxal	4.500	1.170	1,2	—

* piridoxolul, luat ca etalon (activitatea = 1)

Testele biologice: testul de creștere al animalelor *(P. S. Sarma, E. E. Snell, C. A. Elvehjem, 1946)*, perfecționat prin urmărirea vindecării acrodinei la șobolanul carențat; în asigurarea ritmului de creștere au efecte identice în inj.i.p., în timp ce în administrarea *per os*, forma „ol" este mai activă decît formele „al" și „amino".

Metode biochimice și clinice: *Determinarea* principalului metabolit urinar al omului, *acidul piridoxic*, prin convertirea cu acizi la lactona fluorescentă.

Testul de încărcare cu L-triptofan (50 mg/kg greut. corp. la copil și o doză de 2 g la adult): deoarece în carența B_6 se înregistrează scăderea activității kinureninazei (enzimă PALPO-dependentă), eliminarea urinară a peste 30 mg acid xanturenic/24 ore, indică un deficit B_6.

Testul de încărcare cu metionină, care în prezența PALPO, determină o eliminare crescută a cistationeinei *(K. Krishnaswamy, 1972).*

Determinarea PALPO într-un sistem de tirozin-apodecarboxilază (izolat de exemplu, din *S. faecalis*), prin reacția Tirozină $\rightarrow$ Tiramină + CO_2, apreciind manometric CO_2 format *(G. E. Boxer, B. S. Pruss, P. L. Gothart, 1957).*

Stimularea in vitro prin vitamina B_6 *a glutamic-oxalacetic-transaminazei* (GOT) din hematii *(K. Krishnaswamy, 1971).*

Unitatea internațională corespunde la 7,5 μg (sau 10 μg) piridoxină și reprezintă cantitatea care administrată zilnic asigură vindecarea acrodiniei șobolanului.

2.1.9.4. *METABOLISMUL VITAMINELOR B_6*

Vegetalele conțin cele trei forme: în levuri și țesuturile animale predomină piridoxalul și piridoxamina, în timp ce piridoxolul se găsește numai în urme. În general, ele apar puțin în forme libere și se găsesc mai ales sub formă de PALPO, enzime sau chelați metalici.

Scanned with OKEN Scanner

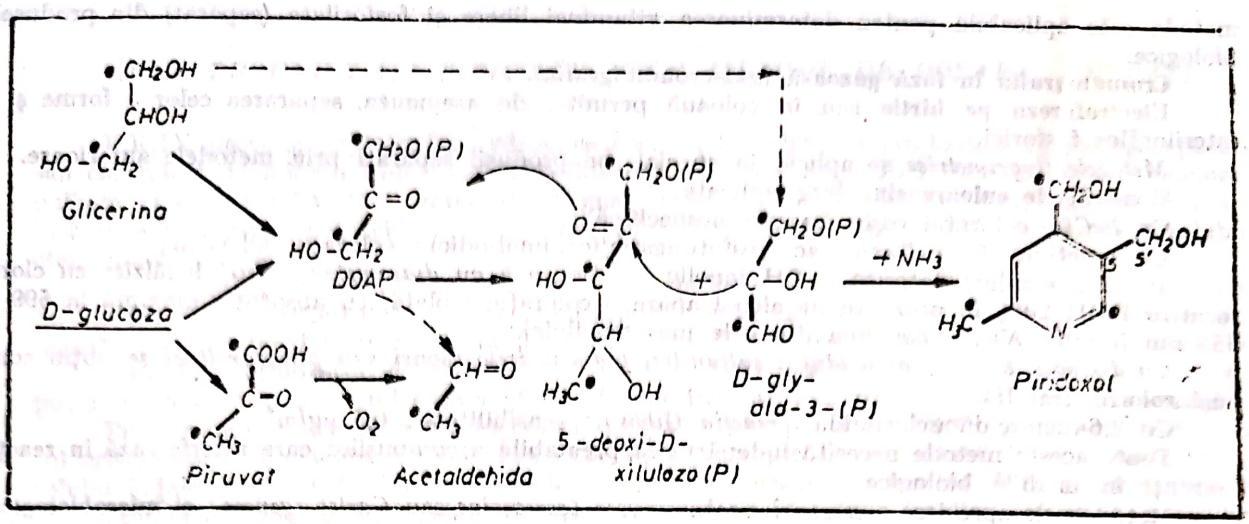


Fig. 2.52. Biosinteza vitaminei B_6 (după F. Korte, M. Goto, 1977)

Etapele biosintezei nu sînt perfect elucidate, dar se admite că majoritatea bacteriilor pot să o sintetizeze. Deoarece la unele bacterii, D-alanina poate înlocui vitamina B_6 s-a sugerat posibilitatea condensării sale cu un acid „C_4-dicarboxilic" pentru a forma piridoxina. Unele bacterii, de exemplu, *E. coli B—166*, sintetizează vitamina B_6, cînd mediul de cultură conţine, serină, glicocol şi glicolaldehidă *(J. G. Morris şi colab., 1959, 1965)*, iar la *Candida albicans*, sinteza vitaminei B_6 este stimulată de acizii aspartic şi glutamic, care sînt generatori ai intermediarilor ciclului citric *(K. Sato, T. Suzuki, Y. Sahashi, 1956)*. O schemă de biosinteză s-a sugerat plecînd de la D-/^{14}C/-glucoză *(fig. 2.52) (R. E. Hill şi colab., 1970, 1972)*.

Transformarea în PALPO în celulele bacteriilor şi diferitele ţesuturi animale (ficat, creier etc.) are loc pe seama ATP, sub influenţa unei piridoxalkinaze, enzimă puternic inhibată de HIN *(cap. 2.1.9.2) (J. Hurwitz, 1953, 1956; D. B. Mc. Cornick, E. E. Snell, 1959)*.

Omul şi şobolanul, pe lîngă vitamina exogenă, primesc o cantitate importantă de vitamină B_6 prin sinteza realizată de flora intestinală, favorizată de alimentaţia bogată în amidon şi dextrine şi inhibată de glucoză. La nivelul intestinului subţire are loc desfacerea formelor „legate" şi absorbţia rapidă sub formă liberă. În cîteva ore după absorbţie, piridoxina ajunge în hematii unde este oxidată la piridoxal şi fosforilată la PALPO, care trece în plasmă *(C. E. Colombini, E. E. Mc. Coy, 1970)*. În sînge, se găsesc 2—4,5 μg/100; în ser 3—8 μg/100 şi sub formă de PALPO, 1 μg/100 şi se depozitează în ficat (5—20 μg/g), muşchi (2—6 μg/g), creier (12—25 μg/g).

Din vitamina ingerată se excretă aproximativ 2—4,4% prin urină (0,5—0,7 mg/zi), în special sub forma metabolitului-acidul 4'-piridoxic (80%), piridoxamină şi alţi metaboliţi, conjugaţi la OH din poziţia 3, şi prin fecale (0,13—0,15 mg/zi la sugari şi 0,7—0,9 mg la adulţi), cu variaţii, în ambele cazuri, în raport de conţinutul alimentar.

După injectarea a 50 mg piridoxină se constată o eliminare de 8% prin urină; eliminări mai scăzute se înregistrează la bătrîni şi în diferite tulburări metabolice; în avitaminoza B_1 şi P.P. eliminarea este foarte scăzută (1,5% sau chiar nulă).

Scanned with OKEN Scanner

2.1.9.5. *ROL BIOCHIMIC. INTERRELAȚII VITAMINICE*

Vitamina B_6 participă în procese biochimice de o deosebită importanță pentru organisme. Piridoxalul formează cu ionii metalici (Me = Cu^{2+}, Fe^{2+}, Al^{3+} etc.) și cu aminoacizii, *chelați*, care se pot scinda în moduri diferite, conducînd la procese de transaminare, decarboxilare, scindări, racemizări, eliminări $\alpha-\beta$ sau $\beta-\gamma$ *(fig. 2.53) (E. S. Snell, 1958)*.

In vivo au loc reacții similare, dar cu intensitate și specificitate mult mai mare, catalizate de enzimele care au ca parte activă (coenzimă) PALPO:

Reacții de transaminare, între un aminoacid oarecare și un α-cetoacid, cu schimbarea reciprocă a grupărilor menționate:

$$R_1-CH(NH_2)-COOH + R_2-CO-COOH \rightleftharpoons R_1-CO-COOH + R_2-CH(NH_2)-COOH$$

dintre care cele mai importante și de interes în diagnosticul clinic sînt glutamic-oxalacetic-transaminaza (GOT) și glutamic-piruvic-transaminaza (GPT). În carența de vitamină B_6, nivelul reacțiilor de transaminare scade (cu aproximativ 66%) și se normalizează prin administrarea vitaminei B_6 sau PALPO *(E. Schlenk, E. E. Snell, 1945)*.

Decarboxilarea aminoacizilor: $R-CH(NH_2)-COOH \rightarrow R-CH_2-NH_2 + CO_2$, cu formarea aminelor, dintre care unele de mare importanță biochimică: histamina, serotonina, cisteamina, sau cu formarea unor noi aminoacizi, de exemplu, Asp → β-Ala; Glu → acid γ-aminobutiric (GABA).

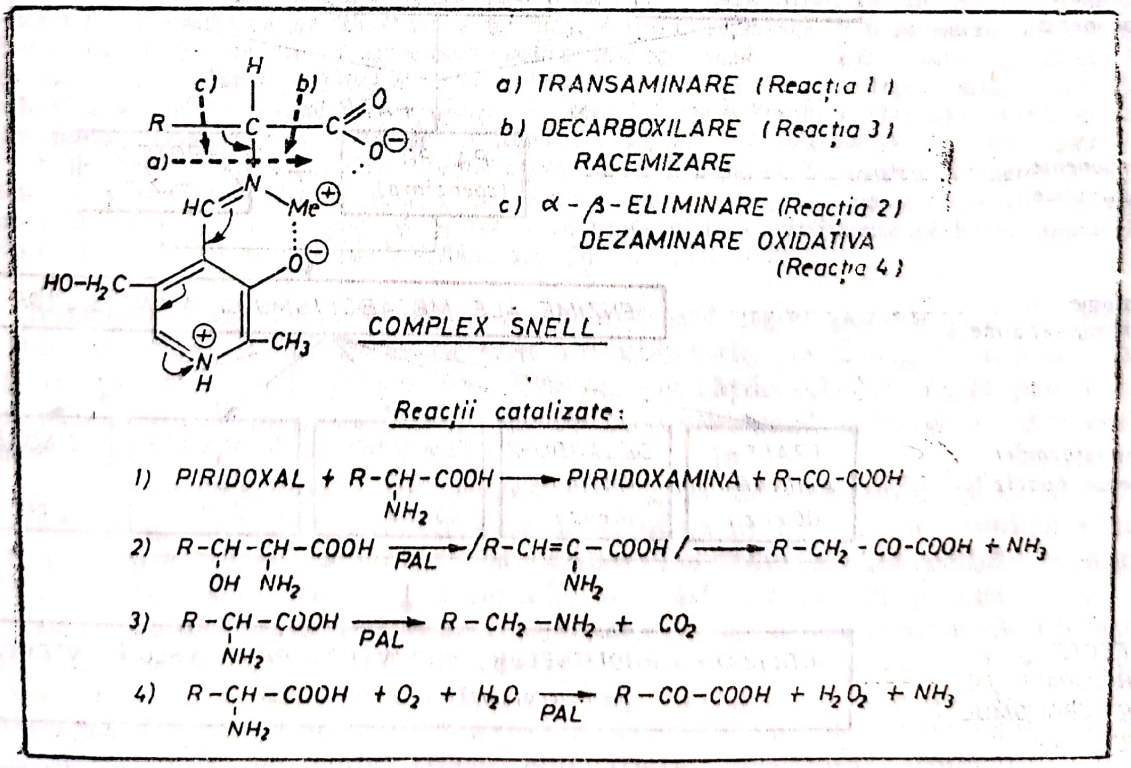


Fig. 2.53. Reacții efectuate de piridoxal (PAL) și piridoxalfosfat (PALPO)

Scanned with OKEN Scanner

Reacţii de scindare (tip „aldolazic") a aminoacizilor, prin hidroximetiltransferaze, care necesită sistemul tetrahidrofolic *(cap. 2.1.15)*: L-Ser + + $FH_4 \rightleftharpoons$ Gli + $FH_4—CH_2OH$, adică: Ser → Gli + „C_1".

Reacţii de eliminare: β-eliminare, în deshidratarea (urmată de desaminare), cum ar fi în cazul Ser, Tre, şi desulfurarea cisteinei; γ-eliminarea; de exemplu: homoserindehidrataza, în transformarea: Homoserină $\rightleftharpoons$ acid α-cetobutiric+NH_3; triptofansintetaza, în scindarea ciclului indolic din triptofan etc.

În *reacţiile de racemizare*: convertirea D-Ala → L-Ala.

În ansamblu, vitamina B_6, sub diferitele sale forme, participă în reacţii de cea mai mare importanţă: în valorificarea proteinelor, absorbţia aminoacizilor, în interconversiunea aminoacizilor pentru asigurarea „echilibrului optim" necesar biosintezei proteinelor, în catabolismul aminoacizilor, cu consecinţe în formarea hormonilor, aminelor biogene, de utilizare celulară şi excreţie, în reglarea (indirectă) a metabolismului glucidic şi lipidic, ce se reflectă în funcţionarea normală a organelor şi ţesuturilor (în special a ţesutului nervos, pielii, sîngelui etc.) *(fig. 2.54)*.

Interrelaţii vitaminice. Dozele mari de vitamină B_6 scad absorbţia intestinală a vitaminei B_1, iar alimentaţia cu exces de tiamină produce apariţia simptomelor acrodiniei şi scăderea transaminazelor. În mod obişnuit, ambele vitamine sînt necesare în cantităţi echilibrate şi de aceea „antagonismul" menţionat apare în cazul excesului uneia dintre aceste vitamine, datorit competiţiei pentru sistemele enzimatice de fosforilare, care le transformă în coenzimele

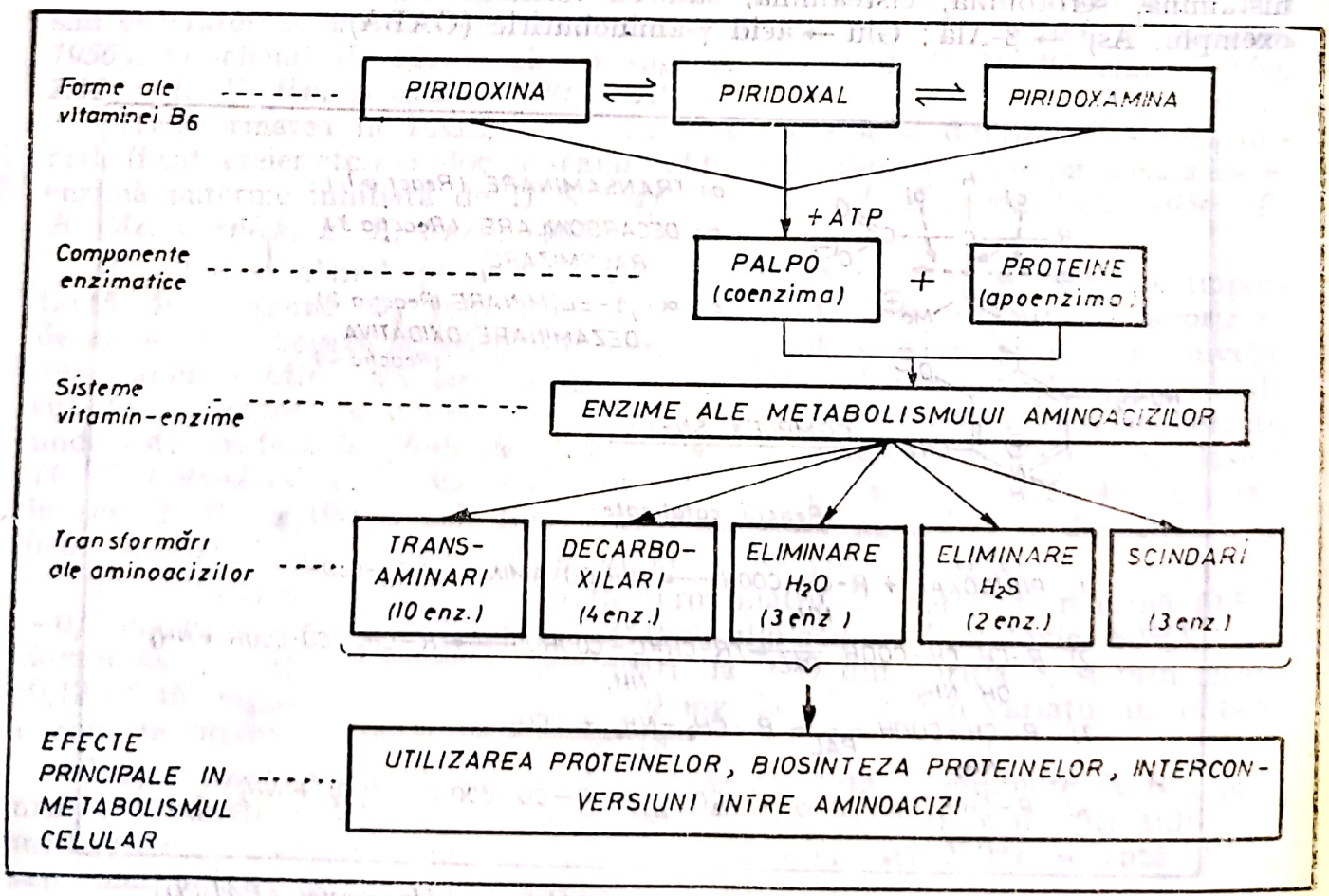


Fig. 2.54. Rolul metabolic al enzimelor cu PALPO (după H. A. Ketz, 1976)

Scanned with OKEN Scanner

active; supradozarea piridoxinei inhibă fosfokinazele implicate în transformarea tiaminei la TPP (inclusiv în biosinteza din flora intestinală), în timp ce excesul de vitamină B_1 inhibă sistemele de fosforilare ale piridoxalului la PALPO.

În carența B_6, se observă creșterea conținutului de vitamină B_2 din ficatul de șobolan; scăderea acidului pantotenic și respectiv a CoA din mușchi și ficat, a nivelului vitaminei P.P. și B_{12} din ficat și ser.

2.1.9.6. *AVITAMINOZA B_6. NECESITĂȚI*

Avitaminoza B_6, prin carență alimentară sau prin antivitamine se manifestă sub forme diferite, după specie.

La șobolan se înregistrează, inițial, stagnarea creșterii și anorexie și apoi *„acrodinia"*, o dermatită simetrică (diferită de cea din avitaminoza PP sau B_2) la nivelul nasului, urechilor, labelor, cozii, caracterizată prin eczemă, căderea părului, tumefacții, edeme ale țesutului conjunctiv din piele; hemoragii; anemie; scăderea capacității de convertire a glucozei și aminoacizilor în lipide, cu afectarea lipidelor cerebrale (sfingomieline, cerebrozide) care, împreună cu nivelul scăzut al GABA, explică unele din tulburările neurologice, ca de exemplu, hiperexcitabilitate, convulsii spontane (crize epileptiforme); afectarea glandelor endocrine și respectiv a hormonogenezei (hipofiză, testiculi, ovare). În aceste manifestări se relevă legătura strînsă cu acizii grași esențiali (AGE, vitamina F, cap. 2.1.5), care au efecte de protecție față de avitaminoza B_6; carența AGE produce dermatite similare acrodiniei, care se agravează prin lipsa concomitentă a vitaminei B_6.

Cîinele carențat prezintă anemie microcitară cu agranulocitoză și manifestările pelagrei canine („limba neagră", „black-tongue"), tulburări nervoase, creșterea volumului unor organe (inimă, rinichi, suprarenale, tiroidă) și degenerescența grasă a ficatului. Maimuța manifestă simptome carențiale similare omului, cu leziuni vasculare degenerative, alopecie, anemie și carii multiple.

Carența vitaminei B_6 are importanță economică, deoarece, la porc, se observă încetarea creșterii, anemie și predomină afecțiunile nervoase: crize epileptiforme și simptome degenerative ale nervilor senzoriali periferici. La puiul de găină nu apar afecțiunile dermice, dar încetează creșterea și se înregistrează convulsii și moartea prematură, scăzînd astfel producția.

Anemiile animalelor piridoxin-deficiente (cîine, porc, maimuță), de tip microcitar-hipocrom, sînt însoțite de creșterea de 2—4 ori a nivelului fierului plasmatic și hemosideroză (ficat, splină, măduva osoasă). Ele nu au un caracter hemolitic (nu alterează „indexul hepatic" și nivelul bilirubinei serice) și se datoresc blocării δ-ALA-sintetazei, enzimă PAPLO-dependentă, care realizează decarboxilarea acidului α-amino-β-cetoadipic la acidul δ-aminolevulinic (δ-ALA), etapă importantă în biosinteza porfirinelor și respectiv a hemoglobinei *(D. W. Martin Jr. și colab., 1983)*.

În general, se apreciază importanța aportului de vitamină B_6 pentru obținerea alimentelor proteice cu valoare biologică ridicată, prin creșterea reproducerii, a corpului animalelor și respectiv a producției de carne, ouă, lapte și de aceea, în unele țări, se suplimentează hrana animalelor cu vitamină B_6 obținută prin sinteză industrială *(H. A. Ketz, 1976)*.

Necesitățile în vitamina B_6 se apreciază la 1 μg/zi pentru pui; 7—10 μg/zi la șobolan. Pentru *om* ar fi necesar un aport de 1—2 mg/zi sau 2,5 mg/zi, în studii pe soldați *(J. C. Plough, 1960)*; cantitățile sub 0,5 mg/zi par a cauza stări carențiale. Copiii, gravidele, femeile care alăptează și bătrînii au necesități crescute *(E. Ranke, S. Tauber, B. Ranke, 1960)*.

Deși o *avitaminoză pură umană* este greu de recunoscut și de delimitat, pe baza manifestărilor caracteristice la diferite animale și în condiții speciale la om, se pot reține ca semne ale carenței: o stare de nervozitate, insomnie, tulburări de mers, dureri abdominale, alterări dermice și anemie.

În argumentarea avitaminozei B_6 umane se pot aduce o serie de observații, legate în special de efectul unor antivitamine B_6 și de manifestările la sugari și gravide. În alimentația deficitară în B_6, dezoxipiridoxina (antivitamină B_6) determină leziuni cutanate eritemoseboreice, mai ales în jurul nasului, ochilor și gurii, alterări ale limbii (roșie, edematiată, dureroasă), limfocitopenie, dar fără fenomene de anemie *(R. W. Vitter, J. F. Mueller și colab., 1950, 1953)*.

Scanned with OKEN Scanner

În cursul terapiei cu HIN apar tulburări care cedează la vitamina B_6, deci pot fi considerate ca manifestări ale carenței sale.

La sugarii hrăniți exclusiv cu lapte fiert sau cu alimente autoclavate la temperaturi ridicate (procedee care distrug vitamina) se înregistrează, într-o proporție de 3—5/1.000, convulsii epileptiforme, hiperexcitabilitate și alterări ale electroencefalogramei, atribuite, în special, deficitului glutamat-decarboxilazei (enzimă cu PALPO) ce are drept consecință scăderea concentrației GABA din creier; toate acestea cedează la inj. i.m. a 100 mg piridoxină *(S. E. Snyderman, L. E. Holt, R. Carreiro, K. Jacobs, 1963)*.

La gravide, testul de încărcare cu DL-triptofan (10 g) crește, mai puternic decît la nongravide, excreția urinară a metaboliților intermediari ai triptofanului, în special a acidului xanturenic. Administrarea vitaminei B_6 scade, în mare măsură, excreția acestor metaboliți și sugerează că graviditatea este însoțită de o deficiență B_6, care poate fi explicată prin necesitățile mari ale fetusului, caracterizat prin procese metabolice foarte intense *(H. A. Harper și colab., 1979)*. Este interesant că frecvența ridicată a dermatitelor periorale și diagnosticul enzimatic indică o stare de carență B_6 la femeile care utilizează contraceptivele orale *(L. Reinken, O. Dapunt, H. Kammerlander, 1973)*.

Similar animalelor piridoxin-deficiente, omul manifestă o anemie microcitară-hipocromă, reversibilă, cu nivele ridicate de fier plasmatic; excesul de fier se depozitează în sideroblaste („anemie sidero-blastică"); se descrie un caz cu tulburări hematologice cronice ușoare, caracterizate prin hipocromie și microcitoză, cu episoade de anemie hipocromă gravă și nivele ridicate ale sideremiei (ce apar aproximativ circa anual); testele de încărcare cu triptofan și vindecarea prin administrarea piridoxinei au confirmat starea de carență B_6 *(J. W. Harris, 1956; A. J. Ersler, W. B. Castle, 1960)*. Alături de participarea PALPO în δ-ALA-sintetază și prin aceasta în biosinteza porfirinelor și hemului, se poate lua în considerare și efectul antianemic al piracinelor, înrudite cu piridoxina *(cap. 2.1.9.2; fig. 2.49)*, probabil metaboliți ai acesteia.

Carența în piridoxină, prin scăderea activității enzimei de transaminare a acidului glioxilic la glicocol — la fel cu deficitul în Mg^{2+} — determină hiperoxalurie, cu formarea calculilor de oxalat de calciu *(S. N. Gerhoff, 1970)*; adăugarea vitaminei B_6 *(A. Mugler, 1970)* crește nivelul citraților renali și contribuie astfel la dizolvarea oxalaților (efecte similare manifestă și ionii de Mg^{2+}); administrarea simultană a piridoxinei, citraților și sărurilor de Mg manifestă efecte superioare în combaterea oxaluriei *(I. Manta și colab.)*.

Carența în vitamină B_6 scade semnificativ capacitatea de anticorpogeneză și rezistența la infecții, de exemplu, la șobolan față de shigelle și pneumococul tip I. Cifra fagocitară și indexul fagocitar (determinat pe sîngele de șobolan, în prezență de *Micrococcus candidus*) arată un paralelism cu carența, respectiv cu cantitățile de vitamină B_6 din hrană; activitatea fagocitară a leucocitelor polimorfonucleare scade proporțional cu deficitul în vitamine B și, respectiv, crește cu adăugarea acestora: efectele optime sînt produse de vitamina B_6 și B_2, în timp ce vitamina B_1 și acidul pantotenic au efecte mai reduse *(I. Gonțea, 1968)*. Carența B_6 favorizează dezvoltarea în cavitatea bucală a *Lactobacillus acidophilus* și împiedică dezvoltarea *L. casei*. Acest dezechilibru explică, cel puțin în parte, creșterea proporției cariilor demonstrate la om, în special în graviditate și în terapia cortizonică și sugerează că vitamina B_6 are, în doze de 1—2 mg/zi, un rol protector pentru dentiție *(L. P. Stream și colab., 1956, 1957)*.

Scanned with OKEN Scanner

Între „leziunile biochimice înnăscute" se menționează *„boala genetică în răspunsul la piridoxină"*, datorată deficitului primar al cistationsintetazei, care se relevă la sugari prin anemii, xantin-acidurie, cistationurie și homocistinurie și care răspund favorabil la administrarea unor cantități mari de vitamină B_6 *(S. H. Mudd, 1971)*.

Cercetările pe animale arată că după administrarea unei doze mari de piridoxină (10 mg. i.p.), șobolanii supuși unui efort (bandă rulantă, înot), la temperatura camerei și în special la temperaturi ridicate, elimină o cantitate dublă de vitamină B_6 și metaboliți ai acesteia (față de animalele de control), ceea ce sugerează utilitatea suplimentării cu această vitamină și cu proteine cu valoare biologică ridicată a alimentației de protecție a muncitorilor care lucrează la temperaturi ridicate, și, în general, a celor care depun eforturi mari fizice *(E. Maftei, D. Bedeleanu și colab., 1956)*.

Tuberculoza *per se* și terapia acesteia cu hidrazida acidului izonicotinic (HIN), antivitamină B_6 și P.P., este frecvent însoțită de semnele carenței vitaminei B_6: afecțiuni psiho-neurologice și musculare (sindroame maniaco-depresive, polinevrite, parestezii, slăbire și dureri musculare); tegumentare (eriteme pelagroide); sanguine (anemie, hipoprotrombinemie) etc. Se sugerează formarea unui complex inactiv „PALPO—HIN" care se elimină prin urină. În terapia intensivă cu HIN (10—15 mg/kg greut. corp./zi, timp de 4—6 săptămîni) se înregistrează, pe lîngă manifestările clinice menționate, un test anormal al încărcării cu piridoxină (pierderi urinare exagerate); scăderea importantă a activității transaminazelor serice și a disponibilului de vitamină P.P., prin blocarea etapelor de biosinteză din triptofan vitamin B_6-dependente, argumentate prin creșterea excreției acidului xanturenic în proba de încărcare cu 10 g triptofan. Se consideră că HIN crește de 10—20 de ori necesitățile în vitamină B_6, prin efectul de antivitamină (formarea complexului „PALPO—HIN", inactiv enzimatic) și/sau prin creșterea eliminării urinare a vitaminei B_6 și a metaboliților săi. Dintre pacienții cărora li se administrează doze convenționale de HIN (2—3 mg/kg/zi), un număr de 2—3% manifestă nevrite; la doze mai mari (20 mg/kg/zi), 40% din pacienți manifestă neuropatii și respectiv o alterare a metabolismului triptofanului (acid xanturenic) și care cedează la administrarea vitaminei B_6. Aceste observații sînt valorificate în fixarea dozelor de HIN cu eficiență terapeutică maximă și cu evitarea reacțiilor adverse; la baza diferențelor de răspuns menționate stă profilul farmacogenetic al pacienților cu privire la polimorfismul enzimelor de acetilare (N-acetil-transferaze hepatice), care manifestă, în populații mari, diferențe în raport de 1 : 4. Pentru a obține efectul terapeutic optim este necesară administrarea aceleiași doze de HIN, zilnic, la acetilatorii „rapizi" și, săptămînal, la acetilatorii „lenți"; nerespectarea acestui program de administrare poate duce, la aceeași doză de HIN, la lipsa de efect la primii și, respectiv, la apariția reacțiilor secundar-adverse (neuropatii periferice) la ultimii *(I. Szórády, 1973; C. T. Dollery, 1975; D. Bedeleanu, M. Kory, 1976)*.

2.1.9.7. *INDICAȚII TERAPEUTICE*

Preparatele de vitamină B_6 sînt recomandate în afecțiunile cardiace: infarct, insuficiență cardiacă; ateroscleroză (asociată cu heparină); în hipertensiunea arterială; afecțiuni musculare (distrofii, dureri musculare, greutate la efort); hematologice (anemii microcitare și aplastice, leucopenie, agranulocitoza); neurologice și psihice (insomnie, epilepsie, parkinsonism postencefalic sau neatero-

sclerotic, paraplegie spastică, encefalită, coree Sydenham, sindrom Méniere, scleroză diseminată, astenie nervoasă, uneori în asociere cu acidul glutamic); tulburări dermice (dermatite carențiale seboreice, acnee, eczeme); în glosită, keiloză, stomatită (50—100 mg/zi în asociere cu vitaminele B_2, P.P.); la gravide (vărsături, grețuri matinale); în pelagra P.P.-rezistentă (cu fenomene neurologice, hematologice); hepatita epidemică; boala de iradiație, respectiv Roentgenterapie; în polinevritele toxice și medicamentoase, în special în tuberculoză și terapia cu HIN, precum și în administrarea *per os* a sulfamidelor și antibioticelor cu spectru larg (care afectează flora intestinală generatoare de vitamină B_6).

2.1.10. ACIDUL NICOTINIC. NICOTINAMIDA. VITAMINA ANTIPELAGROASĂ. VITAMINA P.P. NIACINA. NIACINAMIDA

Boala menționată într-un tratat de medicină chinez (1216) și aceea descrisă sub numele de „mal de la Rosa" *(G. Cassal, 1730)* și de *pella-agra* (piele aspră, brună) *(Fr. Frappolli, 1771)* sau „scorbut italian" (cauzat de alimentația cu porumb) *(G. B. Marzani, 1810)* a fost atribuită, mai tîrziu, pe baza apariției sale la alienații din azile hrăniți cu regim sărac în carne, lipsei unui factor care a fost denumit „pelagra-preventing factor" sau vitamina P.P.

Din istoricul lung al pelagrei și vitaminei P.P. se pot menționa o serie de cercetări care au relevat sindromul analog al carenței nicotinice la cobai *(J. Goldberger, R. D. Lillie, 1926)* și la cîini „limba neagră", manifestată prin culoarea neagră-albastră a limbii, afecțiuni ale sistemului nervos central și periferic, alterări hematologice (inclusiv ale spectrului proteinelor plasmatice), degenerescența grasă a ficatului și care se vindeca rapid, la fel ca și carența umană, printr-o alimentație rațională cu conținut ridicat în triptofan și cisteină, precum și printr-un factor termostabil, izolat din drojdia-de-bere și din numeroase produse alimentare *(T. B. Osborne, L. B. Mendel, 1912—1914; J. Goldberger, S. Warring, M. Willets, 1915; R. H. Chittenden, P. P. Underhill, 1917; W. F. Tanner, G. A. Wheeler, 1921—1925)*. Ulterior, acest factor a fost identificat cu *acidul nicotinic și amida sa (C. A. Elvehjem, R. J. Madden, F. M. Strong, D. W. Wooley, 1937)*, cu precizarea că ele se găseau și în „prima vitamină" anti-beri-beri, impură *(C. Funk, 1911—1913)* și că acidul nicotinic a fost obținut, cu mult înainte, prin oxidarea nicotinei *(C. Huber, 1887)* și că acest factor vindeca și pelagra umană *(T. D. Spies și colab., 1938, 1945)*. Rolul biochimic (citoenzimatic) a fost elucidat în urma descoperirii participării sale în structura nicotinamidodinucleotidelor (NAD, NADP), coenzime a unor sisteme enzimatice de o deosebită importanță biologică *(O. H. Warburg, W. Christian, 1934, 1935, 1938)*.

Importante contribuții cu privire la etiopatogenia pelagrei, cu accent pe cauzele social-economice, a formelor de manifestare și a mijloacelor de profilaxie și terapie se datoresc medicilor și cercetătorilor români, *I. Theodori (De pellagra*, teză de doctorat în medicină, *Berlin, 1858)*, *V. Babeș* (împreună cu *V. Sion: Die Pellagra, Viena, 1901)*, *J. Nițulescu (La therapeutique de la pellagre, XXV Congr. Franc. Méd., Paris, 1938)*; *C. Istrati, I. Felix, Gh. Marinescu, C. I. Parhon, I. Hațieganu, I. Nițescu, Al. Slătineanu, M. Ciucă, Marie Sibi, I. Bălteanu, C. Urbeanu, Zoe-Paraschiv-Petrescu, farmacist C. Velescu* și alții. Este de relevat că înainte de elucidarea etiopatogeniei pelagrei *Victor Babeș* spunea: „Leacul pelagrei, al acestei boli a mizeriei, al acestei rușini naționale? Vi-l dau eu: împroprietărirea țăranilor" (1907).

2.1.10.1. *STRUCTURĂ. PREPARARE*

Vitamina P.P. este reprezentată de *acidul nicotinic* sau *niacina:* acidul piridin-β-carboxilic și amida sa, *nicotinamida* sau *niacinamida* (specialiștii consideră amida ca adevărată vitamină și acidul ca o previtamină). Formele active sînt *codehidrazele:* Nicotin-*A*denin-*D*i-*N*ucleotidul (NAD) și forma sa fosforilată (NADP) *(fig. 2.55)*.

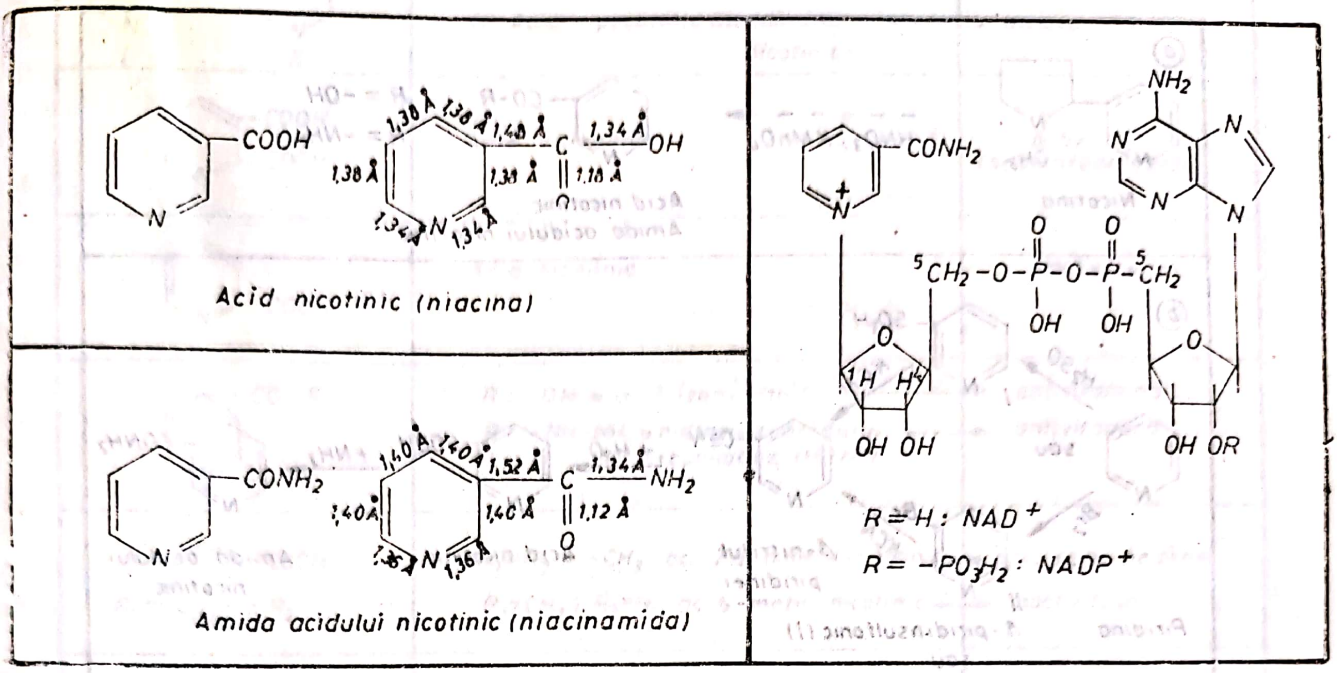


Fig. 2.55. Structura acidului nicotinic, a nicotinamidei şi a coenzimelor NAD+ şi NADP+

Etapele de izolare din produsele naturale sînt hidroliza şi epuizarea hidrolizatelor cu solvenţi organici (cloroform, n-butanol); acidul se separă ca sare de cupru, care se descompune cu H_2S.

Metodele extractive sînt nerentabile şi sînt înlocuite cu cele de sinteză, în diferite variante: din *nicotină*, prin oxidare cu HNO_3 sau $KMnO_4$, metoda iniţial aplicată pentru obţinerea acidului nicotinic *(C. Huber, 1887)*; din *piridină*; din *chinoleină*, prin oxidare la cald cu acizi, în prezenţă de catalizatori (HgO, SeO_2) sau din β-picolină (subprodus al gudroanelor de cărbune, prin oxidare nitrică sau alte metode); din *trigonelină*, prin distilare în curent de HCl *(fig. 2.56)*.

2.1.10.2. *RELAŢII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINE*

Activitatea vitaminică impune respectarea unor caracteristici structurale; alterările moleculei pot conduce la compuşi activi, inactivi sau antivitamine *(fig. 2.57)*, efectul fiind adesea speciodependent.

Prezenţa celor trei duble legături este obligatorie; prin saturare parţială se obţine guvacina şi prin saturare totală, acidul nipecotic, ambele inactive.

Izomeri: acidul picolinic este inactiv; acidul izonicotinic şi hidrazida sa (HIN) sînt antivitamine; HIN se poate substitui în locul nicotinamidei în NAD sau NADP apt pentru a forma chelaţi cu ioni metalici constituind astfel puternice antivitamine P.P. şi B_6 *(cap. 2.1.9.6)*. Acidul chinolenic este un precursor (pe calea biosintezei din triptofan), furnizînd, prin decarboxilare, vitamina P.P. *(cap. 2.1.10.4)*.

Substituirile în poziţia β conduc la o serie de analogi, cu tipuri de acţiune speciodependente. Acidul, amida şi unii esteri manifestă acţiuni vitaminice identice la unele specii (om, cîine, pui de găină) şi acţiuni diferite la altele, de exemplu, pe *C. diphteriae*, acidul este de 10 ori mai activ decît amida, dar pe *B dysenteriae*, amida este de 10 ori mai activă decît acidul.

Înlocuirea unuia sau a ambilor H din gruparea β-CON_2H_2 cu $-CH_3$ sau $-C_2H_5$ duce la derivaţi activi pe om şi cîine; prin înlocuirea grupării NH_2 cu $-CH_3$ (β-$COCH_3$) se obţine 3(β)-acetil-piridina, care este toxică pentru cîinele

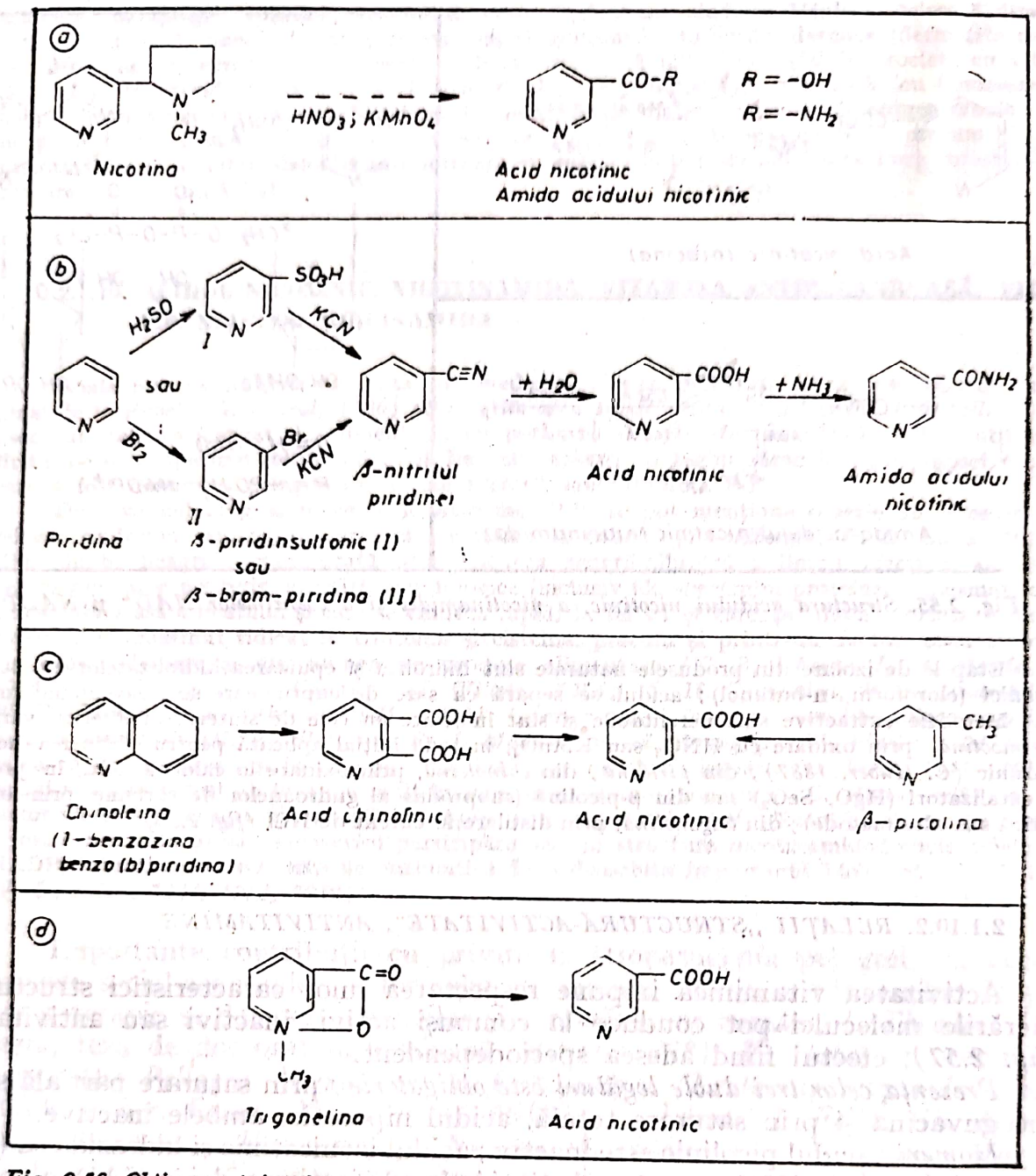


Fig. 2.56. Obținerea prin sinteză a acidului nocotinic și respectiv a amidei sale pe diferite căi (a—d)

tînăr carențat, dar protejează cîinele adult (în doză de 60 mg/zi) față de pelagra canină („limba neagră"); ea provoacă o boală similară pelagrei la șoarece și moartea embrionului de găină, dar nu are efecte antagoniste pe microorganisme *(D. W. Wooley și colab., 1938, 1945; W. T. Beher, W. L. Anthony, 1952, 1953)*. Un dinucleotid cu acetil-3-piridină a fost izolat din țesuturile tumorale și are efecte inhibitoare asupra NAD^+ *(N. O. Kaplan, M. M. Ciotti, 1954)*.

Derivații cu grupare sulfonică sau sulfonamidică în poziția 3(β) sînt bacteriostatici pentru *Staphilococul aureus*, la concentrații mari, și sînt sinergici cu vitamina P.P., la concentrații mici; sînt fără efect și cazul *Proteus X—19*, colibacili și la cîine *(D. W. Wooley și colab., 1938; M. Mc. Ilvain, 1940; D. Mizue,*

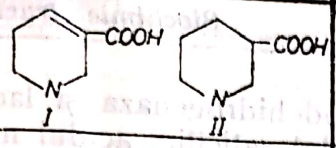
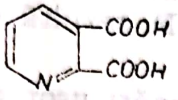
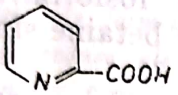
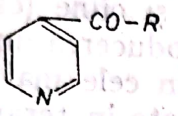
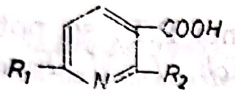
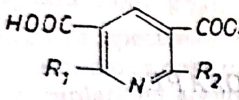
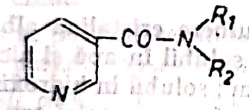
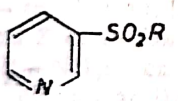
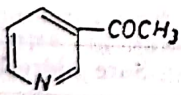
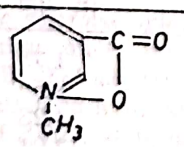
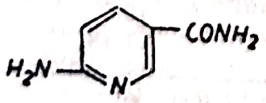
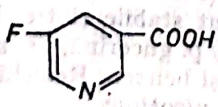
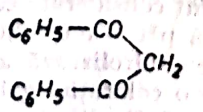
FORMULA	DENUMIRE	ACTIVITATE
	I Guvacina (tetrahidro-nicotinic) II. Acid nipecotinic (hexahidro-nicotinic)	→ inactiv (câine) → inactiv
	Acid chinolinic	activ (se decarboxilează)
	Acid picolinic	inactiv (câine)
	R : –OH = acid izonicotinic R : –NH–NH$_2$ = hidrazida acidului izonicotinic (H.I.N.)	→ antivitamina → antivitamina
	R_1=R_2 = –CH_3 : ac. 2,6-dimetil-nicotinic R_1=CH_3 ; R_2=H : ac. 6-metil-nicotinic	→ pare activ pe câine → inactiv (câine)
	R_1=R_2=H : ac. piridin-3,5-dicarboxilic (ac. dinicotinic) R_1=R_2=CH_3 : 2,6-dimetil-nicotinic	→ activ → pare activ (câine)
	R_1=R_2=H : amida ac. nicotinic R_1=CH_3, R_2=H : N-metilnicotinamida R_1=C_2H_5 ; R_2=H : N-etilnicotinamida R_1=R_2=C_2H_5 : N-dietilnicotinamida	→ vitamina PP → active pe om și câine
	R =OH : ac. β-piridin-sulfonic R =NH_2 : β-piridin-sulfonamida	antivitamine
	3-acetil-piridina	toxică (antivitamină)
	Trigonelină (betaină)	inactivă (om, câine)
	6-amino-nicotinamida	antivitamina puternică
	Acidul 5-fluor-nicotinic	antivitamină
	Dibenzoil-metan	antivitamina

Fig. 2.57. Compuși activi și inactivi (antivitamine) P.P.

Scanned with OKEN Scanner

T. Nojiwa, 1952). Piridin-3(β)-sulfatul inhibă glucozodehidrogenaza și lactico-dehidrogenaza, enzime NAD-dependente, la fel și acidul salicilic, acidul nicotinic, adenina și nucleotidele sale; corelația cu vitamina P.P. rezultă din faptul că NAD înlătură aceste inhibiții.

Azotul piridinei trebuie să fie liber sau să prezinte grupări ușor detașabile, deoarece la acest nivel se face legătura cu restul de riboze fosforilate pentru a forma coenzimele active. Derivații N-metilați și sub formă de betaine sînt inactivi, constituind forme de eliminare *(cap. 2.1.10.4)*.

Prin *introducerea unor metili suplimentari în 2 și 6* și, respectiv, *a unui* —COOH, în plus, în poziția 5 se obțin derivați activi pe om și cîine (cu excepția acidului 6-metil-nicotinic, care este inactiv). În schimb, introducerea unei grupări $-NH_2$ în poziția 6, formează 6-amino-nicotinamida, una din cele mai puternice antivitamine, care, la fel cu acidul 5-F-nicotinic, sînt sugerate în terapia cancerului.

Dintre antivitaminele cu structură nonanaloagă vitaminei P.P. se pot menționa *dibenzoilmetanul* și 1, 3, 4-tiadiazolul *(L. S. Dietrich, I. M. Friedland, L. A. Kaplan, 1958)*.

2.1.10.3. *PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE*

Acidul nicotinic **se prezină sub formă de cristale incolore sau pulbere cristalină albă sau slab gălbuie, fără miros, cu gust slab acru și P.T. 234—239°C. Este puțin solubil în apă și alcool la rece și mai solubil la cald *(tabelul 2.6.)*, greu solubil în eter, benzen, cloroform; solubil în hidroxizi și carbonați alcalini (F.R. IX). Rezistă la aer, la autoclavare la 120°C și la fierbere cu acizi sau baze 2 N, timp de 20 minute.**

TABELUL 2.6

Solubilitatea acidului nicotinic și a sărurilor sale (în g/100 ml) (după **I. M. Slobodin, M. M. Goldman** 1948)

t°C	Acid nicotinic		Sare de sodiu	Sare hidroclorică
	în apă	etanol 96°	în apă	în apă
0	0,86	0,57	9,5	1,73
15	1,3	0,92	23,11	8,5
38	2,47	2,1	—	14,23
61	4,06	4,2	39,11	17,01
78	6,0	7,06	43,2	19,5
100	9,76	—	49,78	21,48

Nicotinamida se prezintă similar cu acidul, dar are P.T. 128—132°C (F.R. IX); există 6 forme polimorfe, cu P.T. 105, 110, 111, 113, 116 și 129°C, dar primele cinci nu sînt stabile și trec în ultima formă. Este mai solubilă decît acidul: 1 p. în 1 p. apă, 5,5 p. alcool 95°, în 10 p. glicerină, de asemenea, în metanol, butanol, acetonă, etilenglicol și greu solubilă în eter, cloroform și benzen. Rezistă la autoclavare la 120°C/20 minute; în prezență de acizi se transformă în acidul nicotinic.

În *aplicațiile farmaceutice* este de remarcat că niacina și niacinamida sînt considerate ca cele mai stabile vitamine. Soluția apoasă 5% are pH = 6,0—8,0, iar cea injectabilă pH = 5,0—7,0; ambele suportă autoclavarea. Este *incompatibilă* cu substanțele acide sau alcaline (hidrolizează amida), cu sărurile de argint (precipitare). Cu acidul ascorbic, în soluții apoase, apare o colorație galben-verde, prin formarea unui complex în raport de 1:1, favorizat la pH = 3,8, cu P.T. diferit de al celor două componente, dar acestea își păstrează integral acțiunea vitaminică *(T. J. Macek, 1960; D. E.*

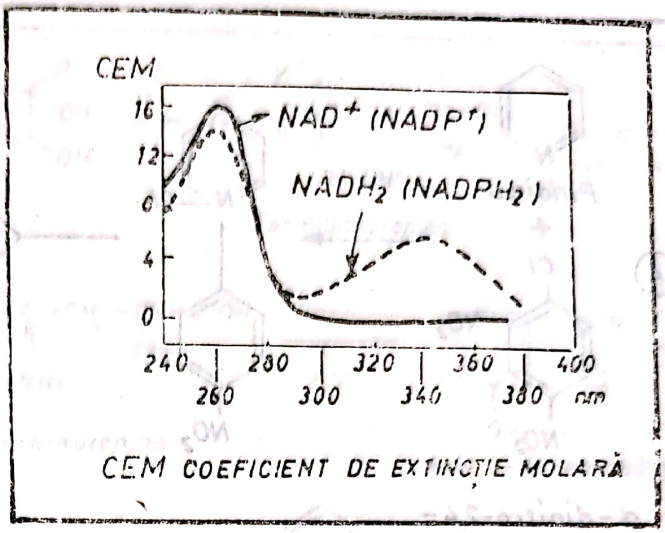


Fig. 2.58. Spectrele de absorbție ale formelor oxidate și reduse ale coenzimelor piridinice

Guttman, D. Brocke, 1963). Soluția 4,49% este izoosmotică cu serul cauzează hemoliza 100% a eritrocitelor după un contact de 45 minute *(V. Stănescu, F. Savopol, 1981)*.

Identificarea acidului nicotinic se poate face prin *metode fizice*; determinarea spectrală în U.V. (soluție apoasă 0,002 g%), cu maximul la 262 nm și minimul la 237 nm (F.R. IX).

Urmărirea spectrelor de absorbție a formelor oxidate și reduse ale NAD și NADP *(fig. 2.58)* permite determinarea coenzimelor și enzimelor NAD- și NADP-dependente și a numeroase alte substanțe, prin reacții cuplate cu acestea, stînd astfel la baza așa-numitelor „teste optice", foarte larg utilizate în laboratorul clinic.

Amida se poate determina prin metode fluorimetrice *(Kotake)* și polarografice, iar metodele cromatografice permit separarea diferitelor forme: acid, amidă, nucleotide (coenzime).

Metodele chimice au la bază numeroase reacții de culoare: — prin condensare cu α-dintro-2, 4-clorbenzen se obține o culoare violacee, care însă nu este specifică, fiind o reacție pentru piridine *(fig. 2.59)*; — cu glucoza, la cald, dă colorații brune similare compușilor „aminoacizi-oze" *(Maillard)*

În reacția *Zincke-König*, bromura de cianogen dă cu compușii piridinici derivați care împreună cu aminele ($R-NH_2$), ca de exemplu, anilină, β-naftilamină, p-aminoacetofenonă, 4-metilaminofenol (metol), clorhidrat de procaină, acid p-aminobenzoic (PAB), acid barbituric etc. conduc la produși de adiție ai dialdehidei glutaconice, colorați *(fig. 2.59)*.

În interpretarea acestor reacții trebuie să se aibă în vedere că ele sînt caracteristice structurii piridinice cu N^{3+}, în care H din 5 și 6 nu sînt substituiți. Amida dă o coloratie de 3 ori mai slabă decît acidul și necesită o hidroliză prealabilă. Utilizarea acidului sulfanilic sau a acidului 2-naftilamino-1-sulfonic permite determinarea diferențiată a acidului și amidei.

Metodele microbiologice, foarte sensibile și specifice, se bazează pe proprietatea de „factor de creștere" pentru unele microorganisme: *Shigella paradisenteriae*, *Proteus vulgaris* (sensibilitatea: 0,3 μg/100 ml), *Tetrahimena piriformis*, *Lactobacillus arabinosus (L. plantarum)*, destul de sensibil (0,4 μg/100 ml) și cu avantajul de a nu se interfera cu triptofanul și metaboliții săi (care acționează ca vitamină PP în testele pe animale); *Leuconostoc mesenteroides* răspunde numai la acid și permite astfel diferențierea de nicotinamidă; se pot utiliza și unele drojdii, ca de exemplu, *Aspergillus nidulans*, *Torula cremoris*, *Rhodotorula aurantiaca* etc.

Metodele biochimice și clinice urmăresc vitaminemia și excreția urinară a vitaminei și metaboliților săi, în special N-metil-niacina (trigonelina) și N-metil-niacinamida (cap. 2.1.10.4). În practică, o cantitate mică din urina colectată în 24 h, adusă la pH 4,5, se trece pe coloană cu zeolit, se eluează cu soluție de KCl, se extrage cu n-butanol și se determină fluorimetric; la un aport alimentar de 50—200 mg vitamină se elimină prin urină aproximativ 20%/24 ore, dar rezultatele sînt falsificate de metaboliții triptofanului *(R. Hochberg, C. Melnic, B. L. Oser, 1945; R. Lecoq, 1967)*.

Dozarea vitaminemiei (normal: 0,4—0,8 mg nicotinamidă/100 ml) prezintă interes, dar nu oferă un element de certitudine, deoarece la unii pacienți cu pelagră, niacinamidemia este normală, în timp ce la unele persoane, fără semne de carență și respectiv în bolile hepatice și în tuberculoză, nivelul vitaminemiei este scăzut. Determinarea coenzimelor nicotinice din globulele roșii nu prezintă avantaje speciale față de dozarea niacinamidei. Un indicator mai semnificativ este conținutul vitaminei P.P. din ficat (normal: 15—17 mg/100 g țesut proaspăt) dar este greu de determinat în clinica umană (necesită biopsii hepatice).

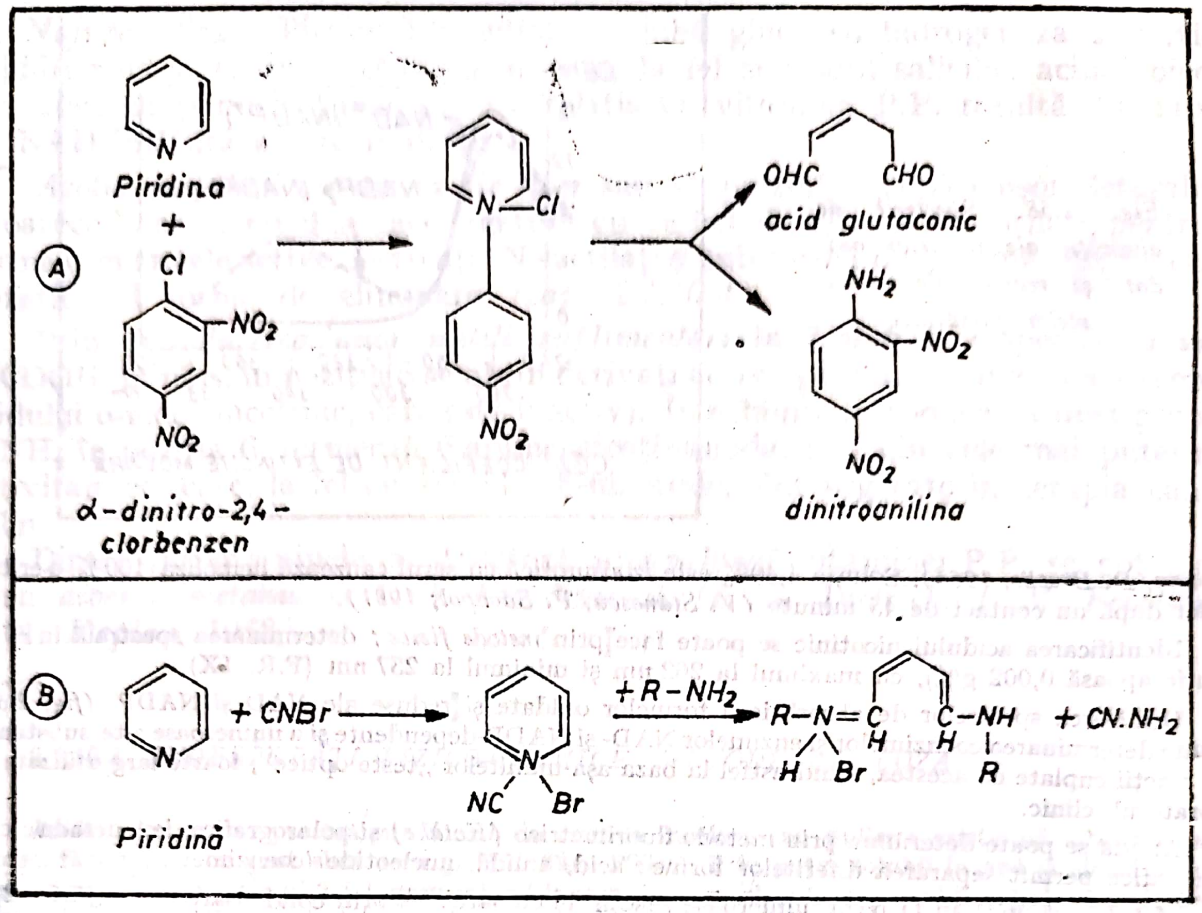


Fig. 2.59. Reacții de culoare pentru vitamina PP, respectiv pentru piridină

2.1.10.4. *METABOLISMUL VITAMINEI P.P. NECESITĂȚI*

Organismul uman transformă ușor acidul, considerat ca previtamină, în amidă, adevărata vitamină și, în continuare, în coenzimele NAD, NADP (codehidraze), forme sub care participă în reacțiile enzimatice.

Necesitățile în vitamină P.P., apreciate la 10—20 mg/zi *(E. Kodicek, 1942; H. Gouenelle, A. Vallette, Y. Raoul, 1945)* sau chiar de 40 mg/zi *(R. J. Williams, 1942)* și respectiv 4,4 mg/1.000 calorii, cu o suplimentare de 3 mg/zi la gravide și 7 mg/zi în perioada de alăptare, sînt acoperite prin aportul alimentar, prin flora intestinală și printr-o biosinteză proprie (endogenă) din triptofan. Convertirea triptofanului la nicotinamidă, mai exact la NAD și NADP, parcurge o serie de etape, elucidate în special prin studiile pe *Neurospora crassa (fig. 2.60)* și necesită prezența vitaminelor B_6, B_2, B_1 și A, a căror lipsă reduce formarea vitaminei; din 60 mg Trp se formează 1 mg vitamină P.P., de aceea unii consideră triptofanul ca o adevărată *„provitamină P.P."*.

Dintre numeroasele argumente în sprijinul formării vitaminei P.P., respectiv a NAD și NADP din triptofan în țesuturile animalelor și ale omului (în special în ficat), probabil pe căi similare celor menționate *(fig. 2.60)*, se pot cita următoarele: prezența tuturor enzimelor necesare biosintezei (de exemplu, în țesuturile șobolanului); formarea, cu viteză mai mare a vitaminei P.P. după administrarea parenterală a Trp, decît pe cale orală (evitarea tractului intestinal); de altfel,

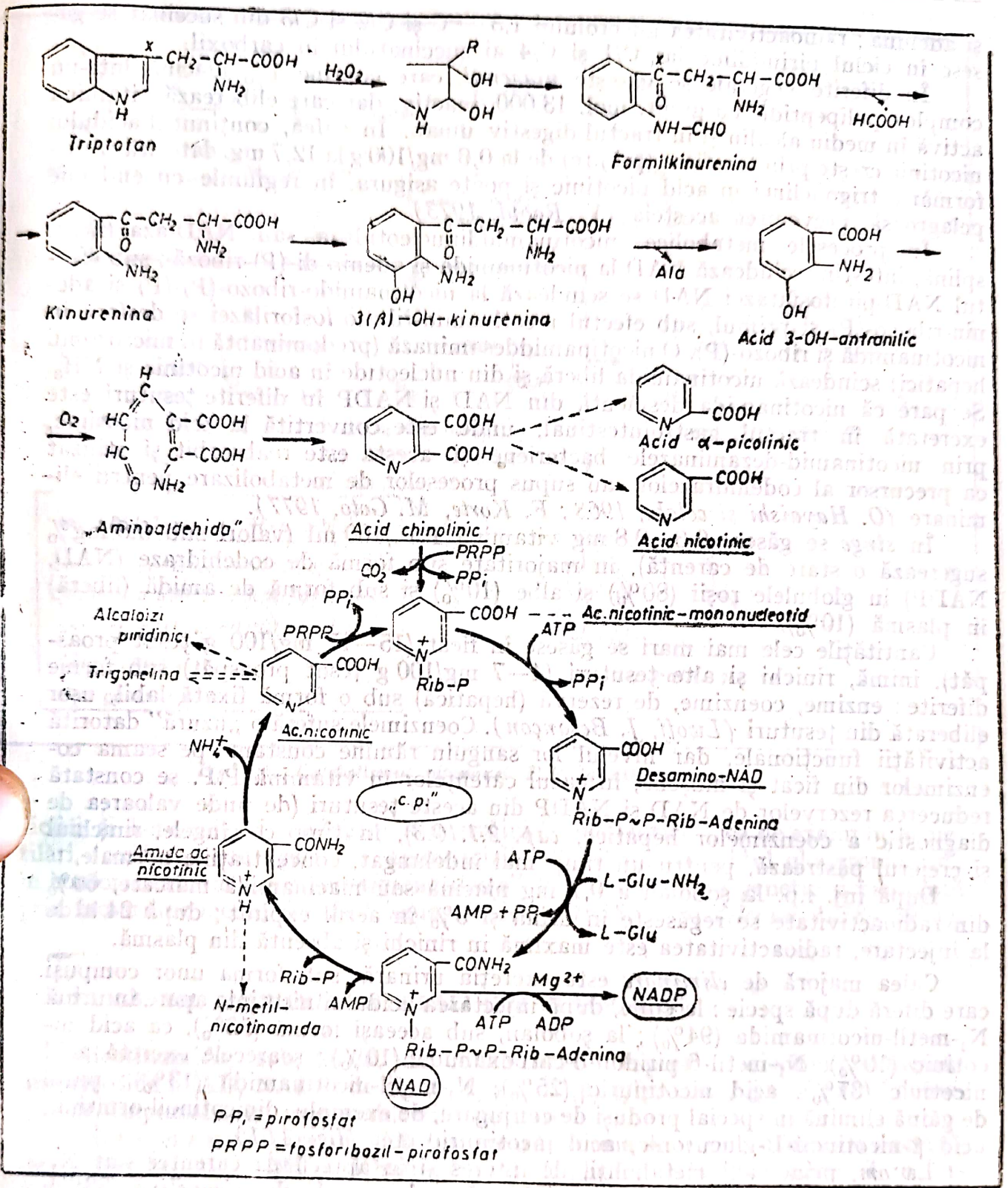


Fig. 2.60. Biosinteza vitaminei P.P. şi a coenzimelor sale, plecînd de la triptofan şi „ciclul piridinnucleotidelor" („c.p.")

convertirea în vitamină persistă şi după îndepărtarea totală a intestinului (chirurgical) la animale; Trp poate înlocui, cel puţin parţial, vitamina P.P. atît la om cît şi la animale şi microorganismele vitamin P.P.-dependente. Cercetările pe *Escherichia coli* relevă ca precursori eficienţi: glicerolul, acidul succinic, riboza

și adenina ; radioactivitatea glicerolului 1,3—^{14}C și C/2 și C/3 din succinat se găsesc în ciclul pirimidinic iar C/1 și C/4 ai succinatului în carboxil.

În diferite vegetale se găsește *niagenul*, care conține 1% niacină într-un complex polipeptidic cu greut. mol. 13.000, inactiv, dar care eliberează vitamina activă în mediu alcalin și în tractul digestiv uman. În cafea, conținutul acidului nicotinic crește prin torefiere (prăjire) de la 0,6 mg/100 g la 12,7 mg. datorită transformării trigonelinei în acid nicotinic și poate asigura, în regiunile cu endemie pelagroasă, prevenirea acesteia *(Y. Raoul, 1973)*.

În procesele metabolice, nicotinamiddinucleotidaza sau NAD-aza (ficat, splină, intestin) scindează NAD la nicotinamidă și adenin-di-(P)-riboză ; sub efectul NAD-pirofosfatazei NAD se scindează la nicotinamido-ribozo-(P)-(P) și adenin-ribozo-(P) și primul, sub efectul nicotinamid-ribozo-fosforilazei se desface în nicotinamidă și ribozo-(P). O nicotinamiddesaminază (predominantă în microzomii hepatici) scindează nicotinamida liberă și din nucleotide în acid nicotinic și NH_3. Se pare că nicotinamida desfăcută din NAD și NADP în diferite țesuturi este excretată în tractul gastrointestinal, unde este convertită la acid nicotinic, prin nicotinamid-dezaminazele bacteriene și acesta este reabsorbit și utilizat ca precursor al codehidrazelor sau supus proceselor de metabolizare pentru eliminare *(O. Hayaishi și colab., 1968 ; F. Korte, M. Goto, 1977)*.

În *sînge* se găsesc 0,6—0,8 mg vitamină P.P./100 ml (valori sub 0,5 mg% sugerează o stare de carență), în majoritate sub formă de codehidraze (NAD, NADP) în globulele roșii (80%) și albe (10%) și sub formă de amidă (liberă) în plasmă (10%).

Cantitățile cele mai mari se găsesc în ficat (15—17 mg/100 g țesut proaspăt), inimă, rinichi și alte țesuturi (4—7 mg/100 g țesut proaspăt) sub forme diferite : enzime, coenzime, de rezervă (hepatică) sub o formă fixată labil, ușor eliberată din țesuturi *(Lwoff, J. Besançon)*. Coenzimele suferă o „uzură" datorită activității funcționale, dar nivelul lor sanguin rămîne constant pe seama coenzimelor din ficat și mușchi ; în cazul carențelor în vitamină P.P. se constată reducerea rezervelor de NAD și NADP din aceste țesuturi (de unde valoarea de diagnostic a coenzimelor hepatice, *cap. 2.1.10.3*), în timp ce sîngele, rinichiul și creierul păstrează, pentru un timp mai îndelungat, concentrațiile normale.

După inj. i.p. la șobolan a 0,7 mg niacină sau niacinamidă marcate, 60% din radioactivitate se regăsește în urină și 3% în aerul expirat ; după 24 h de la injectare, radioactivitatea este maximă în rinichi și absentă din plasmă.

Calea majoră de *eliminare* este excreția urinară, sub forma unor compuși care diferă după specie : la cîine, după injectarea acidului nicotinic apare în urină N_1-metil-nicotinamida (94%) ; la șobolan, sub aceeași formă (56%), ca acid nicotinic (10%), N_1-metil-6-piridon-3-carboxamidă (10%) ; șoarecele excretă acid nicotinic (37%), acid nicotinuric (25%), N_1-metil-nicotinamidă (13%) ; puiul de găină elimină în special produși de conjugare, de exemplu, dinicotinoil-ornitina, acid β-nicotinoil-D-glucuronic, acid nicotinuric etc. *(fig. 2.61)*.

La *om*, principalii metaboliți, de interes și în aprecierea carenței sînt N_1-metil-nicotinamida și lactona sa, cunoscute sub numele de *trigonelină* (33%), reprezentînd 5—10 mg/24 ore, din totalul de 10—44 mg derivați urinari ai vitaminei P.P. inactivi (valorile sub 1 mg/24 ore indică o stare de carență P.P.) ; la aceasta se adaugă N_1-metil-6-piridon-nicotinamida (40%) ; niacina, niacinamida, acidul nicotinuric (totalul lor reprezintă 6% din cantitatea eliminată).

Din cele expuse rezultă că animalele dispun de căi de metabolizare variate și specifice *(fig. 2.61)* pe care le utilizează, obișnuit, și în cazul altor compuși

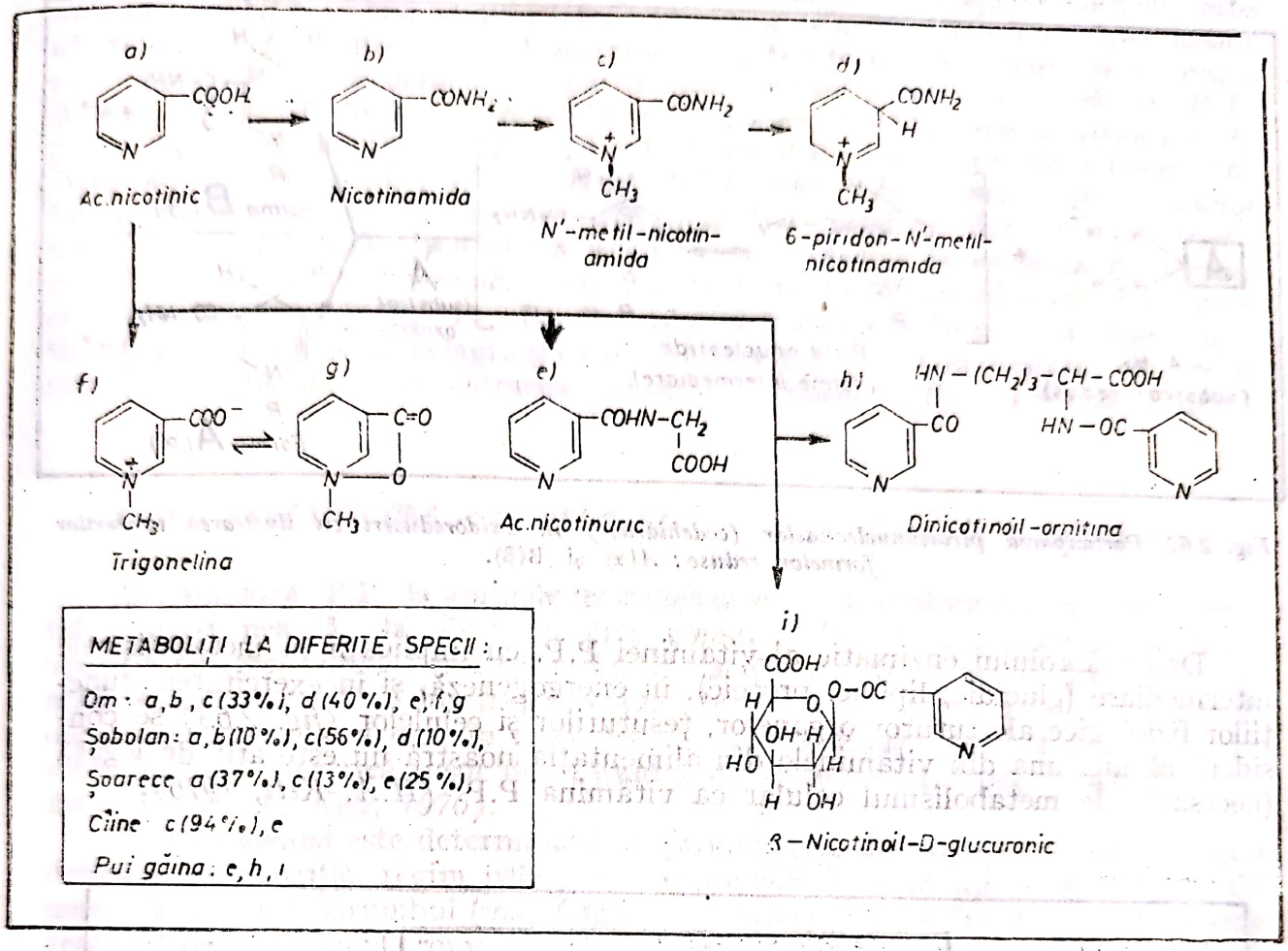


Fig. 2.61. Catabolismul vitaminei P.P. la diferite specii

ciclici şi heterociclici, endogeni sau străini („xenobiotici"), ca de exemplu N-metilări, oxidări, conjugări cu aminoacizii (Gli, Orn), cu acidul glucuronic etc., în conformitate cu *„enzimoindividualitatea"* lor, determinată genetic şi modulată prin factorii de mediu *(D. Bedeleanu, M. Kory, 1976; D. Bedeleanu, 1978—1985)*.

2.1.10.5. *ROL BIOCHIMIC. INTERRELAŢII VITAMINICE*

Nicotinamida, sub formă de codehidraze, respectiv nicotinamidadenindinucleotide (NAD, NADP) de tip A (α) sau B (β) *(fig. 2.62)* joacă un rol deosebit de important în oxidoreducerile celulare.

Dintre enzimele care implică (generează) forma A se pot menţiona: acetaldehid-DH hepatică (DH = dehidrogenază), D-glicerat-DH din spanac; L-malat-DH din muşchiul cardiac şi germenii de grîu; lactat-DH din muşchi, inimă, lactobacili; dihidroorotat-DH din *Zymobacterium oroticum*; dintre cele care implică forma B: α-glicerofosfat-DH din muşchi; 3-(P)-gliceraldehid-DH din drojdie, muşchi; glutamat-DH din ficat; β-hidroxisteroid-DH din *Pseudomonas*; NADH-citocrom C-reductaza din ficat, inimă; NADPH-trans-DH din *Pseudomonas*; NADH-diaforaza din inima de porc; unele generează ambele forme, de exemplu, „diaforazele lui Weber".

Scanned with OKEN Scanner

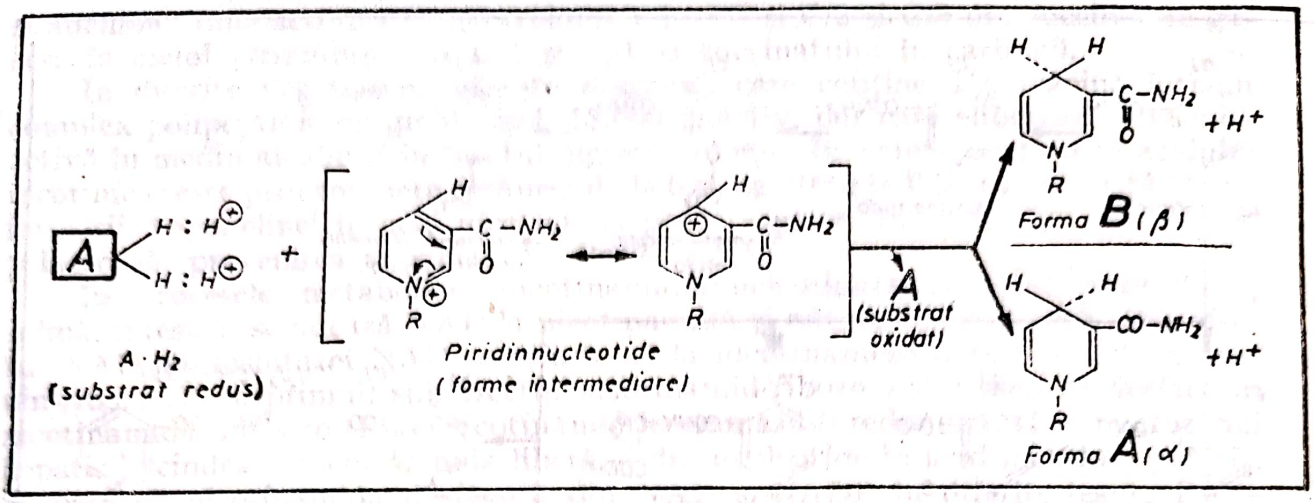


Fig. 2.62. Participarea piridinnucleotidelor (codehidraze) în oxidoreduceri cu ilustrarea izomerilor formelor reduse : A(α) şi B(β).

Datorită rolului enzimatic al vitaminei P.P. cu implicaţii în metabolismele intermediare (glucidic, lipidic, proteic), în energogeneză, şi în exercitarea funcţiilor fiziologice ale tuturor organelor, ţesuturilor şi celulelor *(fig. 2.63)* se consideră că nici una din vitaminele din alimentaţia noastră nu este atît de legată (necesară) de metabolismul celular ca vitamina P.P. *(H.A. Ketz, 1976).*

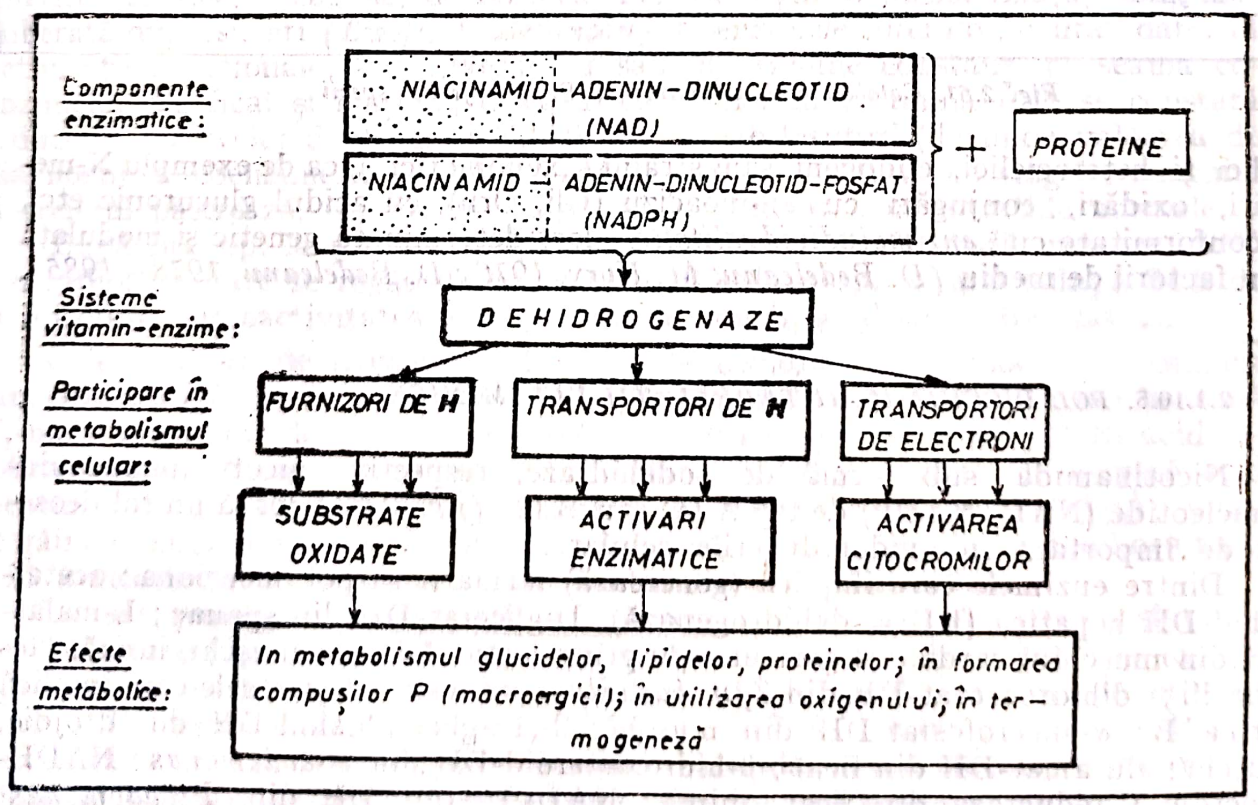


Fig. 2.63. Schemă simplificată a mecanismelor de acţiune şi a rolului biochimic al enzimelor cu vitamină P. P. (după H. A. Ketz, 1976)

Scanned with OKEN Scanner

Interrelații vitaminice. În exercitarea efectelor fiziologic-biochimice este necesar un *echilibru optim* al diferitelor vitamine și de aceea excesul sau lipsa unora afectează funcțiile altora. Astfel, tratamentul intensiv (cu doze mari) și prelungit cu vitamină B_1 sau C determină apariția sindromului pelagros *(J. Lehman, H.E. Nillsen, 1933; P. Braendstrup, 1940; O. Salvesen, 1940)*; carența vitaminei B_1 și/sau B_6 scade puternic conținutul vitaminei P.P. din ficatul de șobolan *(K. Bhaguat, P. Devy, 1949; W. W. Hurt, B. T. Sheer, H. Denel, 1949)*; carența biotinică nu scade nivelul niacinei din ficatul de șobolan, dar alterează conținutul și raportul $NAD^+/NADP^+$ și activitatea enzimelor dependente de acestea *(L. Ababei, M. Cotrău și colab., 1968, 1969)*. Carența în niacină duce la scăderea concentrației vitaminelor B_1, B_2, B_6; administrarea simultană a acidului nicotinic și a acizilor folici în pelagră și ca stimulatori în procesul de creștere, are efecte superioare față de administrarea numai a uneia *(Th. Terroine, 1966)*.

2.1.10.6. *AVITAMINOZA P.P. PELAGRA*

Avitaminoza P.P. la animale interesează sub aspectul modelului experimental („limba neagră" la cîine) și prin consecințele economico-sociale-igienice; apariția pelagrei porcilor și a tulburărilor la păsările de curte și vite determină scăderea productivității lor (reproducere, durată de viață, cantitatea de carne, ouă, lapte), ceea ce a dus, în unele țări, la suplimentarea hranei animalelor cu vitamină P.P. sintetică (ușor de obținut industrial) sau cu concentrate de vitamine B *(H. A. Ketz, 1976)*.

Pelagra umană este determinată, în primul rînd, de cauze alimentare: regim deficitar, subnutriție, regim pelagrogen și survine la populațiile care au ca alimentație de bază porumbul (mămăligă) sau melasa de trestie de zahăr și este agravată de alcoolismul cronic. Efectul pelagrogen al porumbului și a altor cereale se explică prin valoarea biologică scăzută a proteinelor pe care le conțin (zeina din porumb este foarte săracă în triptofan și alți aminoacizi esențiali), prin nondisponibilitatea acidului nicotinic, care se găsește sub forma unui complex inactiv „niacitina" care conține pentoze, acizi cinamici substituiți și probabil un aminofenol *(E. Kodicek, P. W. Wilson, 1960)*, precum și prin posibilitatea existenței unor antivitamine naturale.

Identificarea pelagrei ca o boală carențială datorită lipsei vitaminei P.P. a condus la administrarea acesteia în profilaxie și terapie. Totuși, în unele cazuri, chiar aportul mare (peste 1 g/zi) a fost lipsit de eficiență, vindecarea obținîndu-se prin schimbarea alimentației, cu creșterea conținutului de alimente bogate în proteine cu valoare ridicată biologică, de exemplu, carne, ouă, lapte *(J. Nițulescu și colab.)*. Alimentația săracă, pe bază de proteine incomplete (ca cele din porumb, melasă), cu valoare biologică scăzută lipsesc organismul de triptofan, sursă importantă de vitamină P.P., și afectează, prin lipsa concomitentă și a altor aminoacizi esențiali biosinteza sistemelor enzimatice, care necesită aminoacizii pentru construirea părții lor proteice. Importanța deosebită a alimentației, condiționată de factori social-economici, a fost genial intuită de *V. Babeș* încă în anul 1907 *(cap. 2.1.10)*. Apariția unor simptome ale pelagrei în alcoolismul cronic, ciroze hepatice, diabet, boli febrile, tireotoxicoze, în care se înregistrează capacitatea scăzută de transformare a triptofanului la vitamină P.P., ilustrată prin alterarea raportului eliminării metaboliților acestora, în favoarea intermediarilor și metaboliților

Scanned with OKEN Scanner

triptofanului față de a vitaminei P.P. și a metaboliților săi normali, arată clar importanța biogenezei endogene din triptofan.

O serie de cercetări relevă caracterul de boală cronică, cu accentuări periodice, favorabil influențată de o alimentație corectă și de agenți terapeutici nespecifici, ca de exemplu, preparate arsenicale *(V. Babeș)* sau feruginoase *(I. Hațieganu, Bliss)*. Pe de altă parte, la unele populații un aport de 8 mg/zi sînt suficiente pentru prevenirea pelagrei, în timp ce la altele, apar semnele carenței chiar la 15—20 mg/zi. Pentru explicarea acestei situații s-a emis ipoteza existenței în alimentația ultimilor a unor antivitamine naturale, constituind astfel un regim pelagrogen (*Eycrod, Svaminatan*, în India), dar, pare mai probabilă, instalarea unei carențe generale proteice, cu conținut sărac în triptofan, pe baza căreia pelagra a fost asimilată cu o „deficiență proteică" *(Efremov)*.

Observația că nicotinamida protejează codehidrazele (NAD, NADP) față de acțiunea unor enzime hidrolitice, coenzimnucleotidaze (din creier, plămîn, ficat) a fundamentat concepția *biochimico-enzimatică* a pelagrei, conform căreia în carența P.P. (indiferent de cauza care o inițiază) are loc o degradare enzimatică mai intensă a codehidrazelor (neprotejate, prin deficit de nicotinamidă) și imposibilitatea resintezei lor la nivelul necesar, din cauza lipsei părții active (nicotinamidă) și respectiv a părții apoproteice de care se leagă în enzimele active biochimic (prin deficitul aminoacizilor esențiali, între care un loc special revine triptofanului, implicat și în biosinteza endogenă a NAD și NADP)

Manifestările pelagrei umane implică tulburări complexe, cu simptome clinice diferite. În cercetările experimentale pe voluntari lipsiți de vitamină P.P. timp de 6 luni, jumătate din grupul studiat prezenta *„anicotinoza"*, cu astenie, dispepsie, eriteme. Această formă diferă de pelagra obișnuită, care se instalează pe fondul unei carențe cronice (de ani de zile) în vitamină P.P. (și alte vitamine) și proteică și, în consecință „pelagra" și „anicotinoza" nu sînt entități strict superpozabile. Pelagra este expresia unei „avitaminoze P.P. — dominantă", dar unele din simptome sînt independente de carența nicotinamidei, deoarece se cunosc forme de pelagră a căror manifestări clinice sînt condiționate de alimentația prezentă sau trecută, de vîrstă, de stările patologice, de condițiile social-economice.

V. Babeș descrie cinci stadii în evoluția pelagrei: preeritematos; eritematos simplu; de agravare (mai ales a simptomelor digestive); de stabilizare a leziunilor permanente (nervoase, cardiace, vasculare) și starea de caşexie și respectiv de complicații.

Simptomele majore ale pelagrei se pot cuprinde în triada celor „3 D": Dermatită (eriteme), Digestive, Demență (tulburări neuro-psihice). În această ordine de idei, pelagra se caracterizează prin următoarele simptome:

D—1). Tulburări dermice (sindrom cutanat), eritemul pelagros, caracteristic, pe părțile expuse la soare: fața dorsală a mîinilor („mănușile" pelagrosului), partea dorsală a picioarelor și gleznelor („cizmele" pelagrosului), pe obraji, nas, bărbie, frunte (eritem „în fluture"), la gît și în regiunea sternului („cravata lui Cassal"). V. Babeș descrie apariția eritemului pe spatele unui țăran, acolo unde avea cămașa ruptă, relevînd astfel efectul soarelui în apariția eritemelor.

Manifestările dermice debutează cu roșeață (eritem), însoțită de dureri ascuțite, pustule cu lichid galben (similare celor din arsuri); după spargerea acestora rămîn coji supurînde, care se usucă, dînd o piele aspră („pella-agra") de culoare roșie-vie, care se închide la culoare și devine brună-castanie, ce conferă bolnavului un aspect caracteristic.

Scanned with OKEN Scanner

Leziunile dermice apar în special primăvara şi vara, prin expunere la soare, cu vindecări şi recidive circaanuale; cu timpul însă fenomenele dermice se cronicizează şi se constituie în pielea uscată şi pigmentată, cu fisuri şi crăpături, pe fondul edemului cronic de tip trofic *(H. Gounelle, C. Marnay, 1965)*. Aceste simptome nu sînt obligatorii şi nu reflectă starea de gravitate, deoarece există şi forme de „pelagră fără pelagră" (fără manifestări dermice), caracteristice copiilor, dar care pot apare şi la adult şi care sînt, de obicei, mai grave decît cele cu manifestări dermice.

D—2). Tulburări digestive (gastrointestinale), care pot apare primele (la sfîrşitul iernii, cînd carenţa alimentară este mai accentuată), precedînd astfel, cronologic, sindromul cutanat. La nivelul gurii apar leziuni ale buzelor, înroşirea mucoasei bucale, cu ulceraţii, senzaţie de arsuri, hipersalivaţie; limba este umflată, crăpată, violacee-neagră, dureroasă (glosită); la nivelul stomacului se înregistrează gastralgii constante cu arsuri, greutate, balonare, piroziz ce iradiază pe traiectul esofagian, hipoclorhidrie; afecţiuni intestinale, mai tardive, cu diaree profuză rezistentă la antidiareicele uzuale (pînă la 50 de scaune pe zi, adesea sanguinolente), tenesme, rectite (rectoscopia permite observarea unei rectosigmoidite intense). Ca o consecinţă a acestor leziuni grave se înregistrează alterări puternice în absorbţia alimentelor şi a altor vitamine (în special hidrosolubile) şi se constituie *sindromul policarenţial*.

D—3). Sindromul neuropsihic comportă tulburări interconectate, senzitive, motorii, senzoriale şi debutează cu oboseală, vîjîieli în urechi, pierderea atenţiei şi memoriei, iritabilitate (hiperexcitabilitate), alternînd cu stări de melancolie şi se termină cu „nebunia pelagrosului", caracterizată prin depresii melancolice, psihoze, confuzii mintale, halucinaţii, fobii, care pot dura zeci de ani, ducînd adesea la sinucideri (în special prin înec).

Simptomele menţionate („3 D") sînt însoţite de alterări hematologice, anemie (cu valoare globulară scăzută), porfirinurie (test de apreciere a carenţei, puţin specific), scăderea rezistenţei la infecţii şi la agenţii toxici, deficienţe metabolice ilustrate prin alterarea indicatorilor biochimico-enzimatici etc.

În afara pelagrei „clasice" descrisă se cunosc şi alte forme clinice, de exemplu, la sugar (mult mai rare decît ale adultului), cu tulburări digestive, anemie, încetarea creşterii, dar fără sindromul cutanat. La mamele carenţate, în perioada alăptării (prin excreţia vitaminei în lapte) pot apare numai unele din semnele carenţei: glosită, stomatită, tulburări gastrointestinale (care, în general, nu orientează spre un diagnostic de pelagră); în condiţii speciale (sarcină, stări patologice, malnutriţii) apar fenomene mai tipice de pelagră.

2.1.10.7. *INDICAŢII TERAPEUTICE. HIPERVITAMINOZĂ*

Preparatele de *nicotinamidă* se recomandă în toate manifestările pelagrei; în eritemul solar şi după iradierea cu raze X; în dermatitele alimentare şi toxice; arsuri, degerături, prurit, acnee; în herpes, zona zooster; în enterocolite; în hepatite; în psihoze senile, aterosclerotice, toxice, delirium tremens; în porfirinurii (intoxicaţii cu Pb, barbiturice etc.); în arterite; glomerulonefrite acute, infarct renal etc.

***Acidul nicotinic* nu se administrează pentru efectul vitaminic, deoarece la dozele terapeutice predomină acţiunile farmacologic-terapeutice: efecte vasodilatatoare, manifestate prin hiperemie şi supraîncălzirea pielii; de stimulare a proceselor oxidoreducătoare, cu repercusiuni asupra metabolismului glucidic, lipidic şi proteic şi de inhibare a biosintezei acizilor graşi şi a colesterolului; de stimulare a fibrinolizei (în special în asociere cu heparina şi rutina). Pe baza acestor acţiuni, se utilizează în tulburările circulatorii periferice, angină, astm.**

Scanned with OKEN Scanner

Hipervitaminoză. Între fenomenele produse de excesul de nicotinamidă se înregistrează consumul exagerat al grupelor metil (folosite pentru metabolitii de excreție), cu alterarea proceselor de metilare (ce corespund carenței de colină) ca de exemplu, tulburări respiratorii, digestive, nervoase, ale glandelor endocrine etc.

Excesul de acid nicotinic (dar nu de nicotinamidă) produce vasodilatare periferică cu prurit intens în jumătatea superioară a corpului și stimularea secreției gastrice și a motilității intestinale și o inhibiție a sintezei lipidelor, mai ales a colesterolului; nicotinamida este mai toxică decît acidul nicotinic.

2.1.11. ACIDUL PANTOTENIC. VITAMINA B_3. VITAMINA B_x. FACTORUL (FILTRANT) HEPATIC. FACTORUL ANTIDERMATITIC (ANTIPELAGROS) AL PUIULUI DE GĂINĂ

Acest factor a fost considerat ca un component al complexului „Bios", pe baza efectului de creștere a drojdiei pe medii artificiale *(Wildiers, 1901)*, ca „factor antipelagros al puiului de găină", „factor filtrant al extractelor hepatice", „vitamina B_3" *(A. T. Ringrose, L. C. Norris și colab., 1931, 1936; S. Lepkovsky, T. H. Jukes, 1936; D. W. Wooley, C. A. Elvehjem și colab., 1934, 1938; R. J. Williams, 1931, 1933, 1934, 1938, 1942)*. Datorită răspîndirii sale universale i s-a dat numele de acid pantotenic (pantothen = peste tot); se stabilește structura *(R. J. Williams, R. Major, 1940; R. Kuhn, H. Wieland, 1940)*, se obține prin sinteză *(E. T. Stiller, S. A. Harris, J. Finkelstein, J. Kerestezy, K. Folkers, 1940; T. Reichstein, A. Grüssner, 1940)* și se relevă rolul său, ca parte principală, în alcătuirea coenzimei acetilante (CoA-SH), care a deschis largi perspective în dezvoltarea biochimiei moderne *(F. Lipman, N. O. Kaplan și colab., 1946, 1947, 1954, 1973; F. Lynen și colab., 1951, 1960, 1967)*.

2.1.11.1. *STRUCTURA. RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINE*

Acidul pantotenic este alcătuit din acidul *pantoic*: acidul α, γ-dihidroxi-β, β'-dimetilbutiric, legat peptidic cu β-alanina *(H. K. Mitchell și colab., 1940)*; prin legarea la nivelul alaninei a tioetanolaminei (cisteamina) se obține *panteteina*; atașarea la aceasta a restului -(P)-(P)-Ribozo-(P)-Adenină duce la *coenzima acetilantă* (CoA-SH), care legînd un acetil devine *coenzima acetilantă acetilată (fig. 2.64)*

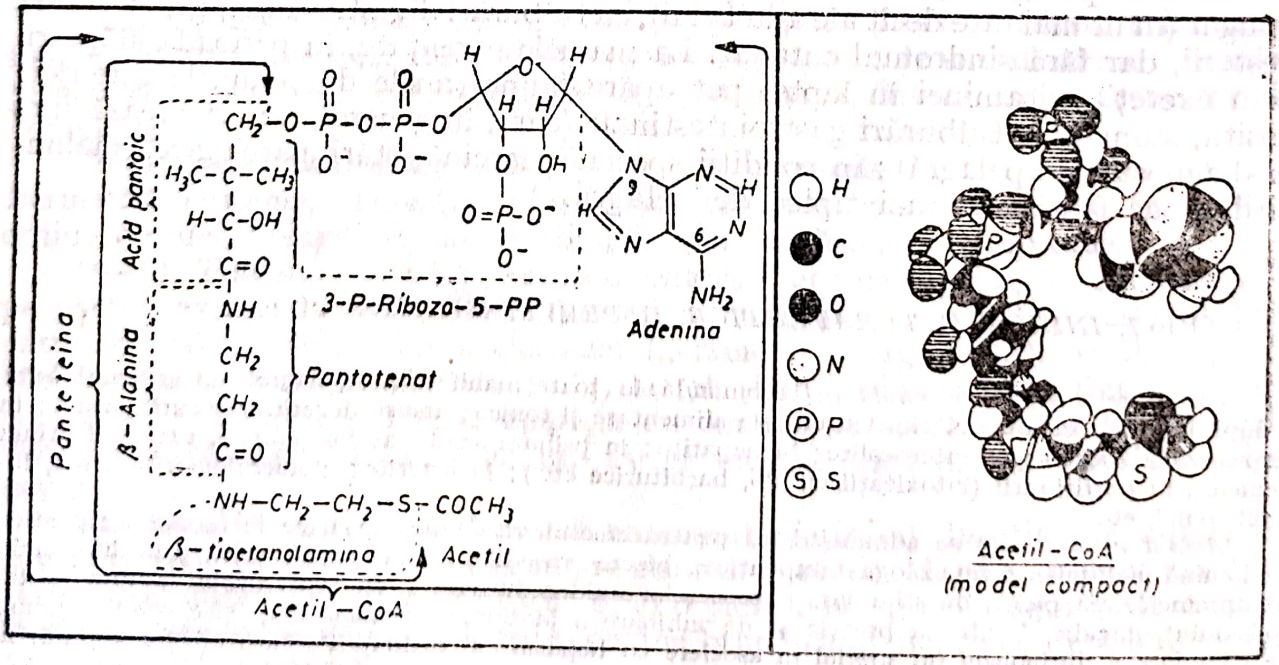


Fig. 2.64. Structura acidului pantotenic și a Acetil-CoA

Analogii sintetici în care acidul pantoic se înlocuieşte cu dihidroxi-valeril, dihidroxi-caproil, dihidroxi-monometil-butiroil etc. au activităţi mai scăzute. Substituirea β-Ala, cu α-Ala sau cu alţi aminoacizi (Asp, Liz) dă compuşi inactivi. Pantotenolul, alcoolul corespunzător acidului pantotenic este activ pe animale, dar inhibitor pe unele microorganisme, de exemplu, *Leuconostoc mesenteroides.*

Pantoiltaurina (cu $-SO_3H$ în locul $-COOH$) este antivitamină. Anilidele sale halogenate (dibromanilin-pantoiltaurina), au efecte antimalarice. Fenil-pantotenona şi analogul său, tolilpantotenona, scad nivelul acidului pantotenic şi inhibă încorporarea sa în CoA la bacterii, sugerîndu-se utilizarea lor în terapia malariei. Pantoilaminoetanolul produce, la animalele carenţate în acid pantotenic, oprirea creşterii şi moartea la şobolan *(fig. 2.65).*

Dintre antagoniştii nonanalogi cu acidul pantotenic se pot menţiona salicilaţii şi derivaţii lor (salol), acidul malonic, acidul 2-clor-4-aminobenzoic, streptomicina etc. a căror efect de inhibiţie asupra creşterii microorganismelor este înlăturat prin adăugarea acidului pantotenic. Cu privire la CoA, apar şi alţi antagonişti care afectează în special gruparea $-SH$, esenţială pentru funcţiile biologice.

La şobolanii cu diabet aloxanic apare o creştere marcată a acidului pantotenic, CoA şi Ac-CoA din ficat *(H. Bühring, J. Kühnau, 1960);* antagoniştii acidului pantotenic (de tipul acidului ω-metil-pantotenic, pantoiltaurină) inhibă şi/sau antagonizează efectul CoA, cu scăderea nivelului său hepatic, şi, în consecinţă, cu acţiuni de reducere a hiperlipemiei, hipercolesterolemiei, hiperglicemiei, glicozuriei, cetonemiei, cetonuriei şi respectiv a gluconeogenezei crescută şi stimulată de hormonii corticosuprarenali (în diabet). Efectele, similare cu ale sulfamidelor antidiabetice (tolbutamidă), au sugerat utilizarea unor asemenea antagonişti în terapia diabetului uman *(R. Lubin, K.A. Daum, W. B*

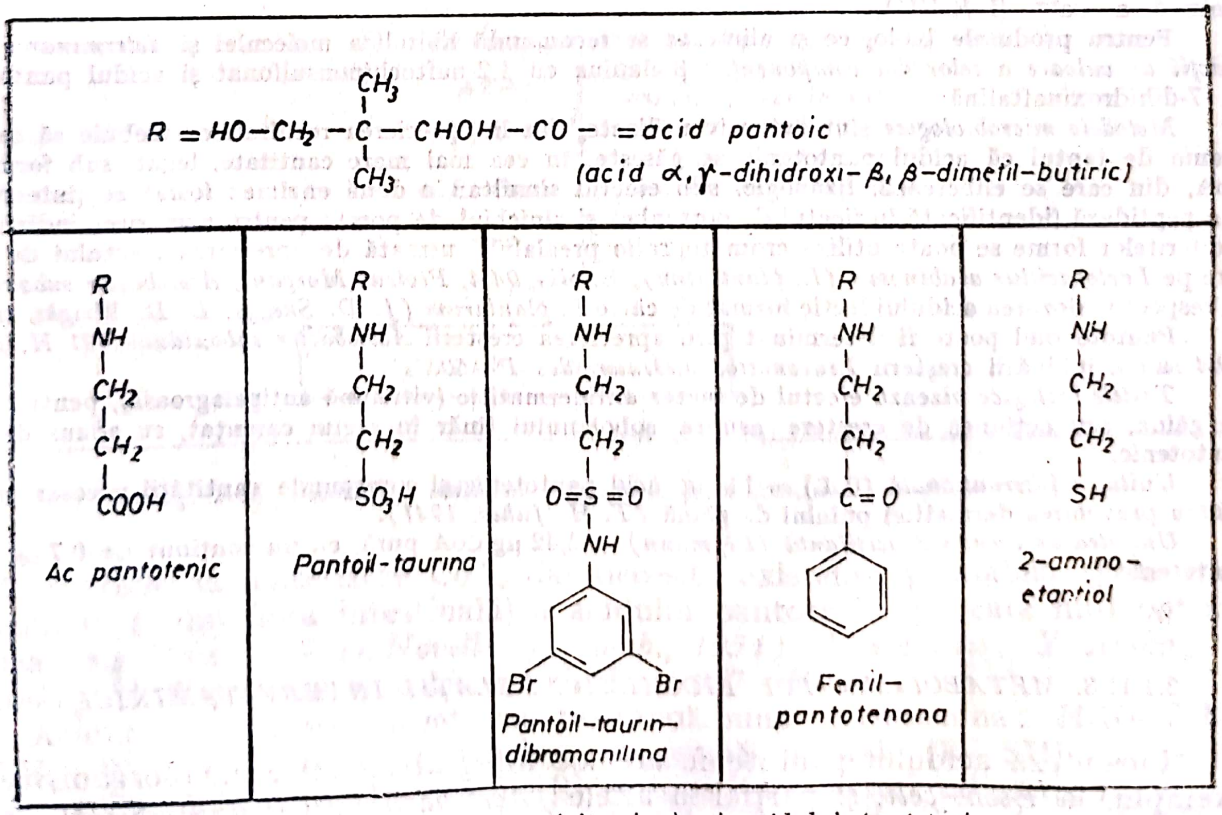


Fig. 2.65. Analogi (antivitamine) ai acidului pantotenic

Bean, 1956; A. D. Goodman, 1960: : J. Kühnau, 1967). Prin faptul că aceste antivitamine determină o serie de reacţii nedorite (adverse) la om şi animale —anemie, scăderea concentraţiei vitaminei C, creşterea piruvicemiei—, s-a exclus posibilitatea utilizării lor în clinica umană *(A. Sheppard, B. C. Johnson, 1957; R. E. Hodges, M. A. Ohlson, W. B. Bean, 1958; C. Pudelkewicz, C. Roderuck 1960).*

2.1.11.2. *PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE. UNITĂŢI*

Acidul pantotenic se prezintă ca un ulei galben, vîscos, solubil în apă, acid acetic şi puţin solubil în alcool etilic, benzen, cloroform, tetraclorură de carbon; prezintă o mare afinitate de adsorbţie pentru cărbunele activ şi este stabil la pH 5,5—7,0, dar labil la încălzire.

În industria farmaceutică se preferă sărurile cristalizate, în special *pantotenatul de calciu* („Calcii panthothenas"), pulbere cristalină, albă, cu P.T. 195—196°C, puţin higroscopic, fără miros, cu gust întîi dulceag, apoi slab amar; uşor solubil în apă (35 g în 100 ml apă, cu reacţie neutră sau slab alcalină), solubil în glicerină, acid acetic glacial, greu solubil în alcool, practic insolubil în cloroform, eter, benzen (F.R. VIII; nu figurează în F.R. IX). Este una din cele mai stabile vitamine din grupul B la încălzire în mediu neutru, dar se descompune uşor în mediu acid sau bazic şi de aceea în soluţii trebuie să se respecte domeniul stabilităţii maxime (pH 5,7—7,0).

Produsul *„Dexpanthenolum"* este mai stabil decît acidul pantotenic şi sărurile sale şi se prezintă sub forma unui lichid vîscos incolor sau slab galben, fără miros, cu gust amar, uşor solubil în apă, uleiuri vegetale şi mai puţin solubil în cloroform (1 : 70) şi în eter (1 : 100).

Soluţiile apoase la pH 3—5 (şi chiar pînă la pH 7) suportă sterilizarea la 100°C/30 minute fără descompunere (spre deosebire de acidul pantotenic şi sărurile sale). Soluţia 5,6% este izoosmotică cu serul. Este incompatibil cu mediile alcaline şi puternic acide (hidrolizează) şi racemizează la încălzire prelungită *(S.H. Rubin, 1960) (V. Stănescu, E. Savopol, 1981).*

Pentru *identificare* şi *dozare* se utilizează diferite metode:

Pantotenatul de calciu poate fi identificat prin tratare cu NaOH, filtrare, adăugare de $CuSO_4$, cînd apare o culoare albastră intensă; prin încălzire la fierbere cu NaOH, răcire şi tratare cu HCl şi $FeCl_3$: culoare galben intensă; pentru determinarea cantitativă se preconizează dozarea complexometrică a Ca^{2+} (F.R.VIII).

Pentru produsele biologice şi alimente se recomandă hidroliza moleculei şi *determinarea prin reacţii de culoare a celor doi componenţi:* β-alanina cu 1,2-naftochinonsulfonat şi acidul pantoic cu 2, 7-dihidroxinaftalină.

Metodele microbiologice sînt extensiv utilizate, dar în aprecierea rezultatelor trebuie să se ţină seama de faptul că acidul pantotenic se găseşte, în cea mai mare cantitate, legat, sub formă de CoA, din care se eliberează, fiziologic, sub efectul simultan a două enzime: fosfataze (intestinale) şi o peptidază (identificată în ficatul de porumbel şi rinichiul de porc); pentru urmărirea individuală a diferitelor forme se poate utiliza cromatografia prealabilă, urmată de aprecierea efectului de creştere pe *Lactobacillus arabinosus (L. plantarum), E.coli—94.4, Proteus Morgani, Acetobacter suboxidans* şi, respectiv, dozarea acidului lactic format de către *L. plantarum (J. D. Skeggs, L. D. Wright, 1944).*

Pantotenolul poate fi determinat prin aprecierea creşterii *Acetobacter suboxidans 621 H, E.coli 99.4* sau a inhibării creşterii *Leuconostoc mesenteroides P—60.*

Testele biologice vizează efectul de factor antidermatitic (vitamină antipelagroasă), pentru puiul de găină, sau acţiunea de creştere asupra şobolanului tînăr în regim carenţat, cu adaus de acid pantotenic.

Unitatea internaţională (U.I.) = 14 μg acid pantotenic şi corespunde cantităţii necesare pe zi pentru prevenirea dermatitei puiului de găină *(T. H. Jukes, 1941).*

Unitatea de coenzimă acetilantă (Lipmann) = 2,42 μg CoA pură, cu un conţinut de 0,7 μg acid pantotenic.

2.1.11.3. *METABOLISM. ROL BIOCHIMIC. RELAŢII INTERVITAMINICE*

Biosinteza acidului pantotenic are loc integral la unele microorganisme, de exemplu, la *Esch. coli*, şi parţial la altele: *Acetobacter suboxidans, Strept. hemolitici* şi la unele linii de *Saccharomyces*. Organismele superioare, inclusiv omul,

Scanned with OKEN Scanner

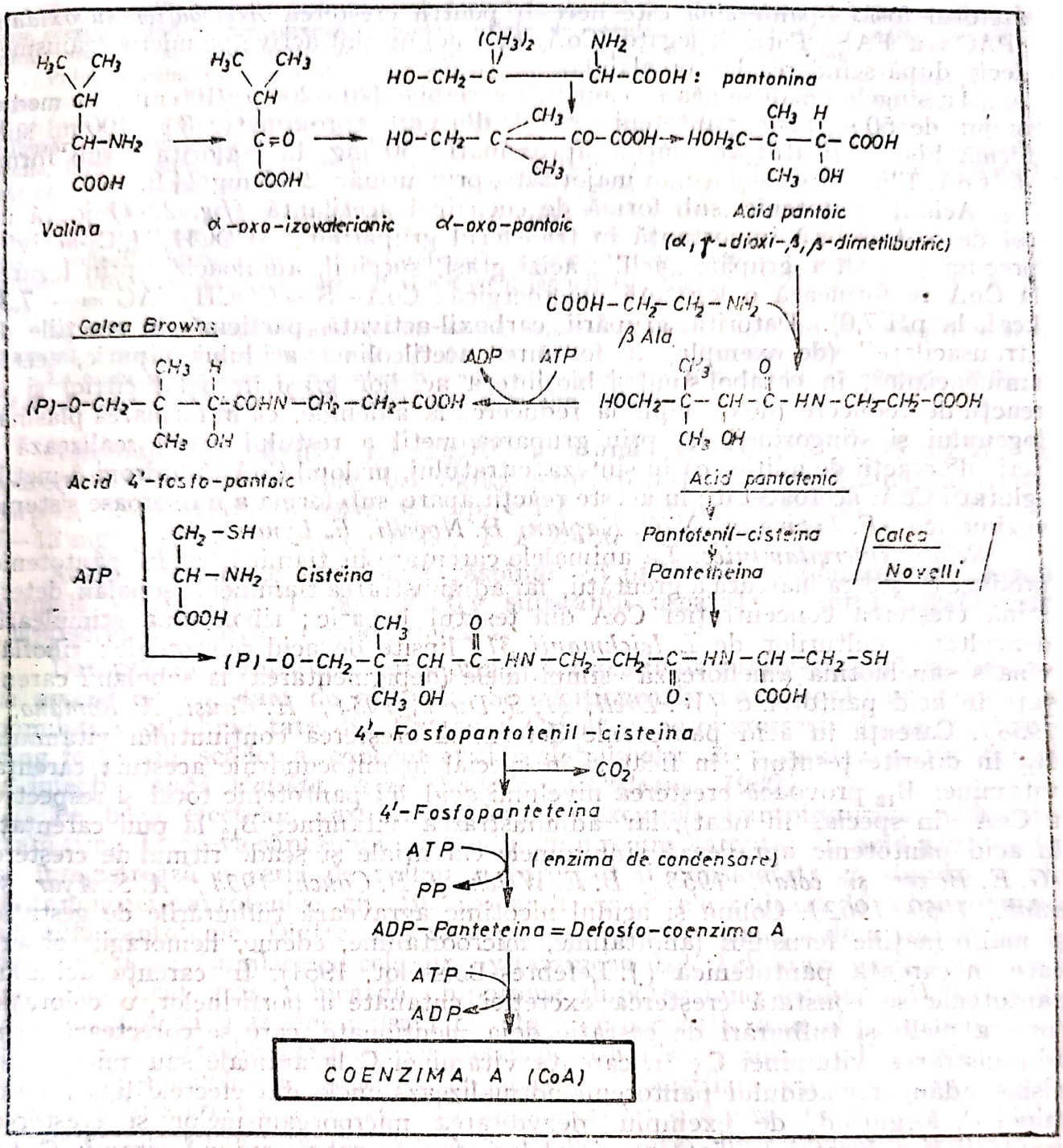


Fig. 2.66. Biosinteza acidului pantotenic şi a coenzimei A (CoA—SH)

sînt capabile să sintetizeze CoA, dar necesită existenţa prealabilă (prin aport alimentar şi din flora intestinală) a acidului pantotenic, pe care nu-l pot sintetiza *(fig. 2.66) (G. D. Novelli şi colab., 1954; J. Shimizu; Y. Abiko; T. Suzuki; M. Tomikawa şi colaboratorii lor, 1967—1970).*

Acidul pantotenic legat cu tioetanolamina (cisteamina: $H_2N-CH_2-CH_2-SH$) reprezintă panteteina în formă redusă (R—SH) şi pantetina, în formă oxidată (R—S—S—R) şi constituie factori necesari creşterii *L. bulgaricus*, de unde denumirea de „lactobacillus bulgaricus factor" (LBF);

factorul fosfo-4-panteteina este necesar pentru creşterea *Acetobacter suboxidans* (PAC sau FAS). Formele legate (CoA, enzime) nu sînt active pe microorganisme,, decît după scindarea lor prealabilă.

În sîngele uman se găsesc cantităţi variabile (20—200 μg/100 ml), în medie, în jur de 50 μg acid pantotenic total, din care aproximativ 3 μg/100 ml sub formă liberă; ficatul ar conţine aproximativ 30 mg, în majoritate sub formă de CoA. Eliminarea se face, în majoritate, prin urină: 2—5 mg/24 h.

Acidul pantotenic, sub formă de coenzimă acetilantă *(fig. 2.64)* joacă un rol de o deosebită importanţă în transferul grupărilor „—$COCH_3$" („C_2-activ"), precum şi a altor grupări „acil": acizi graşi, succinil, aminoacizi; prin legarea la CoA se formează o legătură macroergică: CoA—S ~ $COCH_3$ ($\Delta G = -7{,}38$ kcal, la pH 7,0). Datorită grupării carboxil-activată participă în reacţiile de „transacilare" (de exemplu, în formarea acetilcolinei, acidului hipuric, acetil-aminoacizilor, în catabolismul şi biosinteza acizilor graşi, în ciclul citric) şi în reacţii de reducere (de exemplu la reducerea la aldehide, ca în formarea plasmalogenului şi sfingozinei) iar prin gruparea metil a restului acetil realizează o serie de reacţii de adiţie, ca în sinteza citratului, malonil-CoA, β-hidroxi-β-metil-glutaril-CoA, acetoacetat; în aceste reacţii apare sub forma a numeroase sisteme enzimatice *(F. Lipmann, N. O. Kaplan, D. Novelli, F. Lynen* ş.a.).

Relaţii intervitaminice. La animalele carenţate în tiamină, acidul pantotenic produce creşterea marcată a greutăţii, iar administrarea tiaminei la şobolan determină creşterea concentraţiei CoA din ţesutul hepatic; riboflavina stimulează dezvoltarea culturilor de *L. leichmanii 313* lipsite de acid pantotenic; riboflavina şi/sau biotina ameliorează simptomele (depigmentarea) la şobolanii carenţaţi în acid pantotenic *(W. Drell, M. S. Dunn, 1954; H. Causi, A. Romano, 1958)*. Carenţa în acid pantotenic determină creşterea conţinutului vitaminei B_{12} în diferite ţesuturi: în ficat şi în special în mitocondriile acestuia; carenţa vitaminei B_{12} provoacă creşterea nivelului acidului pantotenic total şi respectiv a CoA (în special în ficat), iar administrarea vitaminei B_{12} la puii carenţaţi în acid pantotenic agravează simptomele carenţiale şi scade ritmul de creştere *(G. E. Boxer şi colab., 1953; B. E. Welch; J. B. Couch, 1954; A. S. Ayar şi colab., 1959, 1962)*. Colina şi acidul nicotinic agravează tulburările de gestaţie şi malformaţiile fetusului (anoftalmie, microoftalmie, edeme, hemoragii) observate în carenţa pantotenică (J. Lefebres-Boisselot, 1951). În carenţa acidului pantotenic se constată creşterea excreţiei cutanate a porfirinelor, o coloraţie roşie a pielii şi tulburări de gestaţie deja menţionate, care se corectează prin administrarea vitaminei C; în carenţa vitaminei C la animale sau microorganisme, adăugarea acidului pantotenic normalizează unele din efectele lipsei vitaminei C, asigurînd, de exemplu, dezvoltarea microorganismelor şi creşterea greutăţii şi a duratei de viaţă a animalelor, dar, la cobai, animal vitamin-C-dependent, pare a creşte necesităţile în vitamină C *(F. De Felice, 1952; G. Everson şi colab., 1953, 1954; F. S. Daft, K. Schwartz, 1958; T. Terroine, 1958, 1959)*.

2.1.11.4. *CARENŢA PANTOTENICĂ. NECESITĂŢI*

După cum s-a menţionat *(cap. 2.1.11.3)*, unele microorganisme pot sintetiza integral acidul pantotenic *(E. coli)*, altele numai parţial *(Acetobacter suboxidans, streptococi hemolitici, unele saccharomicete)*, în timp ce pentru numeroase microorganisme (*Clostridii, Proteus, Pasteurella* etc.) şi pentru insecte este necesar ca factor de creştere.

Toate speciile animale, inclusiv omul, depind de aportul de acid pantotenic şi sînt sensibile la lipsa acestuia, cînd se înregistrează simptome variate ale carenţei, dintre care se pot reţine ca manifestări comune: alterările gastrointestinale (gastrite, enterite) şi dermice (frecvente).

Puiul de găină este, în mod special, tributar aportului alimentar. În carenţă se instalează „pelagra puiului de găină", caracterizată prin hiperkeratinizarea epidermei în jurul ochilor, ciocului şi pe labe, tulburări de penaj, încetarea creşterii, leziuni ale măduvei spinării, la care se adaugă tulburări de ordin biochimic: scăderea rezervelor de acid pantotenic şi CoA (ficat, muşchi), hiperlipemie, hipercolesterolemie, cu infiltrarea grasă a ficatului, depigmentare, anemie. Găina carenţată este aparent normală, dar scade producţie şi fertilitatea ouălor *(C. B. Johnson, 1955)*.

La şobolan şi şoarece, în carenţă, şi la administrarea antivitaminelor se înregistrează rinită hemoragică, tulburări gastrointestinale, leziuni hepatice; necroza suprarenalelor, cu scăderea biosintezei hormonilor steroizi din corticosuprarenală; creşterea vulnerabilităţii ţesuturilor, care duce la tulburări atît a organelor cavitare, cît şi ale pielii (acrodinie); porfirii *(T. F. Zucker, 1958; B. N. Berg, 1959)*.

La cîine apar depigmentarea blănii, leziuni hepatice şi renale, tulburări ale ritmului cardiac, convulsii, hipoglicemie şi chiar comă *(J. M. Mc. Kiblin, C. A. Elvehjem, 1942)*.

La unele specii, carenţa pantotenică scade anticorpogeneza, faţă de virusul influenţei P.R.—8 *(A.E. Axelrod, S. Hopper, 1960)*, confirmată şi în alte situaţii.

Necesităţi: la păsări: 1,1 mg/100 g hrană; la şobolan: 0,01 mg/zi; la şoarece: 0,03 mg/zi; la cîine: 0,1 mg/kg greut. corp./zi; la porc: 0,2 mg/kg greut. corp/zi. Necesităţile *omului* se apreciază la 10 mg/2.500 kcal, respectiv la 7—12 mg/zi *(R. J. Williams, 1942; T. F. Zucker, 1958)*.

Acidul pantotenic este foarte răspîndit în produsele alimentare, de natură animală şi vegetală (1—30 mg/100 g substanţă uscată); o sursă bogată este „lăptişorul de matcă" („gelee royal").

Datorită aportului alimentar şi prin flora intestinală pantotenogenă, *avitaminoza umană* este o stare de excepţie. Se menţionează ca o carenţă pantotenică, la populaţiile subalimentate din Extremul Orient, o acroparestezie denumită „burning feet", cu scăderea concentraţiei γ-globulinelor şi respectiv a rezistenţei la infecţii *(după Matilda Rosetti-Colţoiu, D. Oţeleanu, 1980)*.

Pe baza efectelor antivitaminelor, de exemplu, pantoiltaurina, administrată timp de cîteva săptămîni pe fondul unui regim carenţat în acid pantotenic, se înregistrează o serie de tulburări care pot fi considerate ca simptome ale avitaminozei pantotenice, cu atît mai mult cu cît ele cedează la administrarea acidului pantotenic. Dintre acestea se pot menţiona: senzaţia de arsuri în membrele inferioare (similare cu cele din avitaminoza B_2), tulburări gastrointestinale (gastrite), ficat gras, tahicardie, hipotonie (hipotensiune ortostatică), instabilităţi vasomotorii şi astenie musculară, stare de oboseală, ameţeli, degenerescenţe mielinice ale nervilor periferici cu paralizii, convulsii, comă, scăderea rezistenţei la infecţii şi biochimic: scăderea capacităţii de acetilare, cu toate consecinţele ei metabolice, creşterea excreţiei 17-cetosteroizilor şi a vitaminelor hidrosolubile; infuficienţa corticosuprarenalelor, care explică unele din tulburările menţionate *(W. B. Bean, R. E. Hodges, K. Daum, 1954, 1955; L. Ababei, M. Trandafirescu, 1974)*.

2.1.11.5. *INDICAŢII TERAPEUTICE*

Preparatele de pantotenat de calciu sînt utilizate atît pentru *efectul lor de vitamine*, în combaterea carenţelor alimentare, profilaxia avitaminozelor B (în asociere cu alte vitamine din grupul B), în nevritele periferice, în crampele musculare ale membrelor inferioare, în cursul gravidităţii, pentru prevenirea încărunţirii şi căderii părului (în asociere cu PAB), cît şi pentru *efectele terapeutice*, eventual în asociere cu vitamina C, în hepatita cronică, lupus eritematos, afecţiunile şi respectiv infecţiil-

căilor respiratorii superioare şi, în general, în inflamaţiile mucoaselor (în bronşite), în angina pectorală, hipertensiune, infarct miocardic, ateroscleroză, în afecţiunile aparatului renal-urinar şi local în stomatite, glosite, arsuri, degerături. De asemenea, se recomandă în şocul postoperator, în pneumonie, ileus paralitic şi ca „detoxefiant" în administrarea streptomicinei, pentru evitarea neurotoxicităţii acesteia şi în reducerea efectelor toxice ale salicilaţilor.

Preparatul *Electovit* (complex de vitamine, cu adaus de fosfat de calciu bazic) este indicat în stările policarenţiale B, anemii, anorexie, boli infecţioase, pre- şi postoperator, în convalescenţe (în special la copii), în afecţiuni hepatice acute şi cronice, tulburări gastrointestinale, diabet, reumatism, polinevrite, nevralgii, herpes zooster, dermite seboreice, conjunctivite, irite, hemoragii retiniene; toxicoza gravidică; adjuvant în terapia cu antibiotice cu spectru larg.

Panthenolul (alcoolul corespunzător acidului pantotenic) este indicat în enterocolite, inflamaţiile căilor respiratorii superioare, dermatoze, alopecie, cicatrizarea plăgilor, arsurilor; convalescenţe.

2.1.12. BIOTINA. VITAMINA H. BIOS II (B). FACTOR X. BIOCITINA. COENZIMA R

Deşi a fost considerat în cadrul factorului „Bios" *(Wildiers, 1901)* a fost izolat mult mai tîrziu din gălbenuşul de ou *(F. Kögl, B. Tonnis, 1936)* şi din ficat *(du Vigneaud, 1940)* sub două forme (α şi β); s-a demonstrat identitatea între „Bios II", biotină şi vitamina de protecţie a pielii sau H (H = Haut = piele) *(P. György, D. B. Melville, D. Burk, V. du Vigneaud, 1940)* şi rolul său, sub formă de „coenzimă R" în sistemele enzimatice *(P. M. West, P. M. Wilson, 1939)*. Determinarea structurii chimice *(D. B. Melville, A. W. Meyer, K. Hoffmann, V. du Vigneaud, 1942)* a permis obţinerea prin sinteză *(S. A. Harris, K. Folkers şi colab., 1943, 1945)* şi stabilirea, prin analiza cu raze X, că se găseşte în configuraţia „cis" *(T. Traub, 1956)*.

2.1.12.1. *STRUCTURA. RELAŢII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINE*

Biotina are la bază o structură biciclică formată din condensarea unui nucleu tetrahidroimidazolic cu unul tetrahidrotiofenic şi un lanţ lateral de acid valerianic: $-(CH_2)_4-COOH$ în β-biotina (din ficat) formînd astfel acidul cis-tetrahidro-2-oxothieno/3,4 d/-imidazolin-4-valeric *(fig. 2.67* şi *2.68)*: în α-biotina (din gălbenuşul de ou) lanţul lateral este acidul izovalerianic:

$-CH-CH(CH_3)_2$. Dintre cei 8 stereoizomeri posibili numai forma d-biotină este activă biologic.

Înlocuirea S cu O dă *oxibiotina* care păstrează numai 5 % din activitate pe animale şi 25—30% pe unele microorganisme. Îndepărtarea S (de exemplu, cu Ni) conduce la *destiobiotină*, activă în creşterea drojdiei (care o transformă în biotină) şi inactivă pe *L. helveticus*. *Biotinsulfoxidul* (în care = S este oxidat la =S=O) se comportă diferit: factor de creştere pentru *Aspergilus niger* şi *Neurospora crassa*, prelungeşte supravieţuirea şobolanului carenţat în biotină, dar nu îi asigură creşterea; în unele situaţii este antivitamină.

Biocitina: ε-N-biotinil-L-lizina, izolată sub formă cristalină din autolizatele de drojdie *(L. D. Wright, K. Folkers şi colab., 1950)* manifestă efecte similare biotinei pe *L. casei., Strept. faecalis R., Neurospora crassa, Saccharomyces carlsbergensis*, şi este de 165 de ori mai activă decît biotina în creşterea *Micrococcus sodonensis*, dar inactivă pe *L. arabinosus*. Biocitina nu este o formă enzimatic activă a biotinei dar se scindează la biotină şi L-lizină sub acţiunea biotinolazei, din ficat, muşchi, pancreas, plasmă şi unele microorganisme *(F. Korte, M. Goto, 1977)*.

Scanned with OKEN Scanner

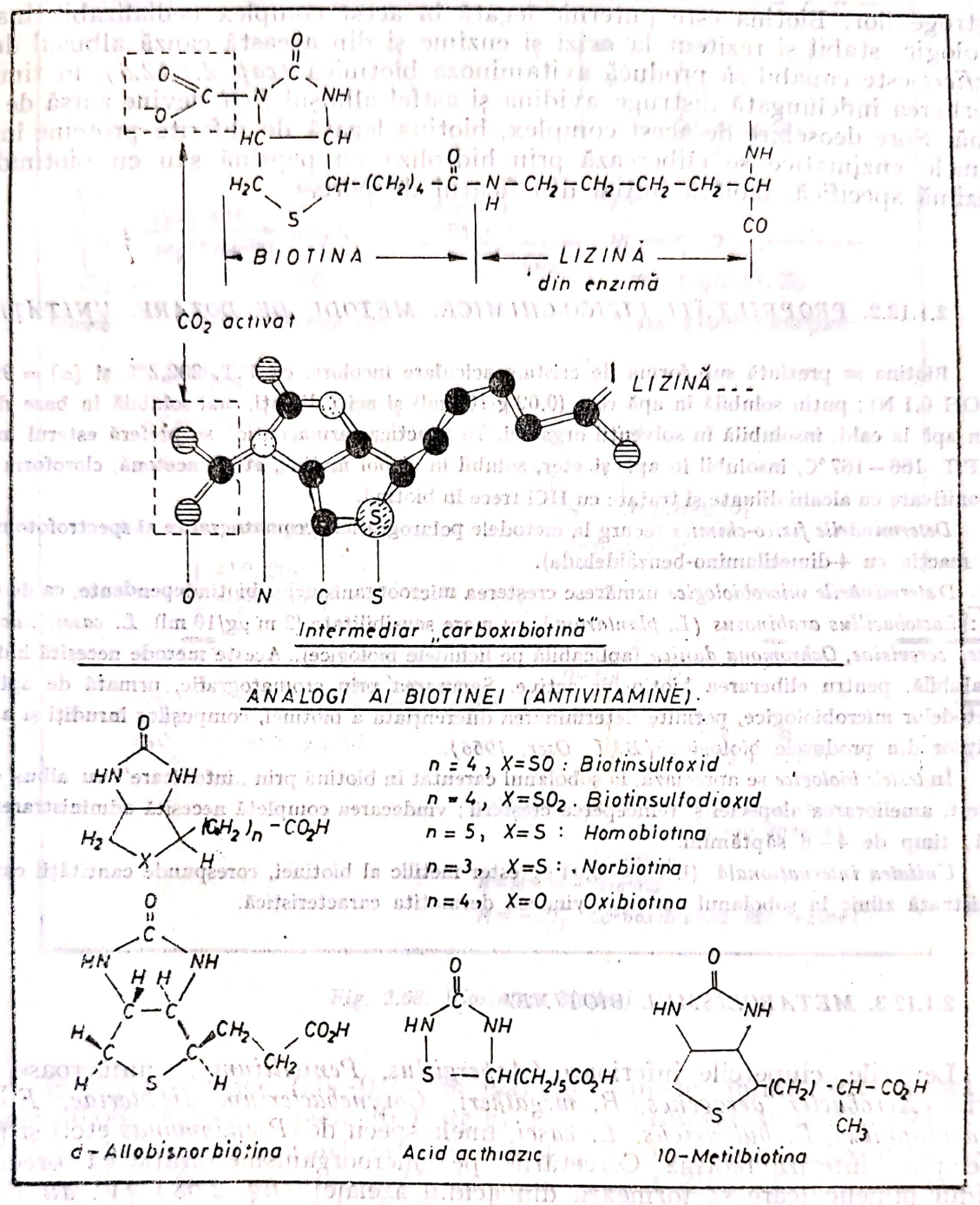


Fig. 2.67. Structura biotinei, carboxibiotinei şi a unor analogi. Biocitina: **ε-N-biotinil-L-lizina; prin lizina legată la CO^- terminal (poziţia 11) se încorporează în enzimă şi reprezintă astfel forma activă enzimatic a biotinei.**

Se cunosc şi alţi analogi *(fig. 2.67)*, de exemplu, *acidul acthiazic* şi *10-metil-biotina*, antibiotice izolate din unele linii de *Streptomyces* ce manifestă inhibiţie competitivă cu biotina la unele microorganisme *(D. G. Martin şi colab., 1971)*.

Complexul avidină-biotină, izolat din albuşul de ou *nefiert* conţine 3 p. biotină şi 1 p. *avidină*, glicoproteină cu gr. mol. 53.100, pHi = 10,5, formată în oviductul păsărilor în stare de activitate genitală şi respectiv sub acţiunea

estrogenilor. Biotina este puternic legată în acest complex nedializabil, inactiv biologic, stabil şi rezitent la acizi şi enzime şi din această cauză albuşul de ou *nefiert* este capabil să producă avitaminoza biotinică *(cap. 2.1.12.5)*, în timp ce fierberea îndelungată distruge avidina şi astfel albuşul *fiert* devine sursă de biotină. Spre deosebire de acest complex, biotina legată de diferite proteine în sistemele enzimatice se eliberează prin hidroliza cu pepsină sau cu biotinidază, enzimă specifică, izolată iniţial din ficatul de porc.

2.1.12.2. *PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE. UNITĂŢI*

Biotina se prezintă sub formă de cristale aciculare incolore, cu P.T. 232,2°C şi $[\alpha] = 92°$ (în NaOH 0,1 N); puţin solubilă în apă rece (0,02 g/100 ml) şi acizi diluaţi, mai solubilă în baze diluate şi în apă la cald, insolubilă în solvenţii organici. În practica farmaceutică se preferă esterul metilic, cu P.T. 166—167°C, insolubil în apă şi eter, solubil în alcool metilic, etilic, acetonă, cloroform; prin saponificare cu alcalii diluate şi tratare cu HCl trece în biotină.

Determinările fizico-chimice recurg la metodele polarografice, cromatografice şi spectrofotometrice (în reacţia cu 4-dimetilamino-benzaldehida).

Determinările microbiologice urmăresc creşterea microorganismelor biotindependente, ca de exemplu: *Lactobacillus arabinosus (L. plantarum)*, cu mare sensibilitate (2 m µg/10 ml), *L. casei*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Ochromona danica* (aplicabilă pe lichidele biologice). Aceste metode necesită hidroliza prealabilă, pentru eliberarea biotinelor active. Separarea prin cromatografie, urmată de aplicarea metodelor microbiologice, permite determinarea diferenţiată a biotinei, compuşilor înrudiţi şi a metaboliţilor din produsele biologice *(B. L. Oser, 1965)*.

În *testele biologice* se apreciază, la şobolanul carenţat în biotină prin „intoxicare" cu albuş de ou nefiert, ameliorarea alopeciei şi reînceperea creşterii; vindecarea completă necesită administrarea, zilnică, timp de 4—6 săptămîni.

Unitatea internaţională (U.I.) = 0,04 µg ester metilic al biotinei, corespunde cantităţii care administrată zilnic la şobolanul carenţat vindecă dermatita caracteristică.

2.1.12.3. *METABOLISMUL BIOTINEI*

Levurile, ciupercile inferioare *(Aspergillus, Penicillium)*, numeroase bacterii *(Aerobacter aerogenes, B. megatheri, Corynebacterium diphteriae, E. coli, L. acidophilus, L. bulgaricus, L. casei*, unele specii de *Pseudomonas* etc.) şi plantele pot sintetiza biotina. Cercetările pe microorganisme arată ca precursor acidul pimelic (care se formează din acidul azelaic) *(fig. 2.68) (V. du Vigneaud şi colab., 1942; F. Korte, M. Goto, 1977)*. O serie de compuşi biochimici au efecte favorabile asupra creşterii microorganismelor dependente de biotină, în lipsa ei: cisteina (pe *Aspergillus niger* şi *Achromobacter*); acidul aspartic şi amestecul treonină+lizină+uracil (pe *L. arabinosus*); acidul lactobacilic (pe bacteriile lactice); acizii graşi nesaturaţi (pot înlocui total sau parţial biotina la unele microorganisme); Tween—80 (de *Staphylococci*) etc.

Absorbţia se face la nivelul intestinului subţire şi necesită, în general, separarea biotinei din complexele în care se găseşte.

Sîngele adultului conţine 12—40 µg/100 ml; distribuţia în diferite organe variază mult, în raport de metodă şi de autor: în ficat, suprarenale (0,4—0,8

Scanned with OKEN Scanner

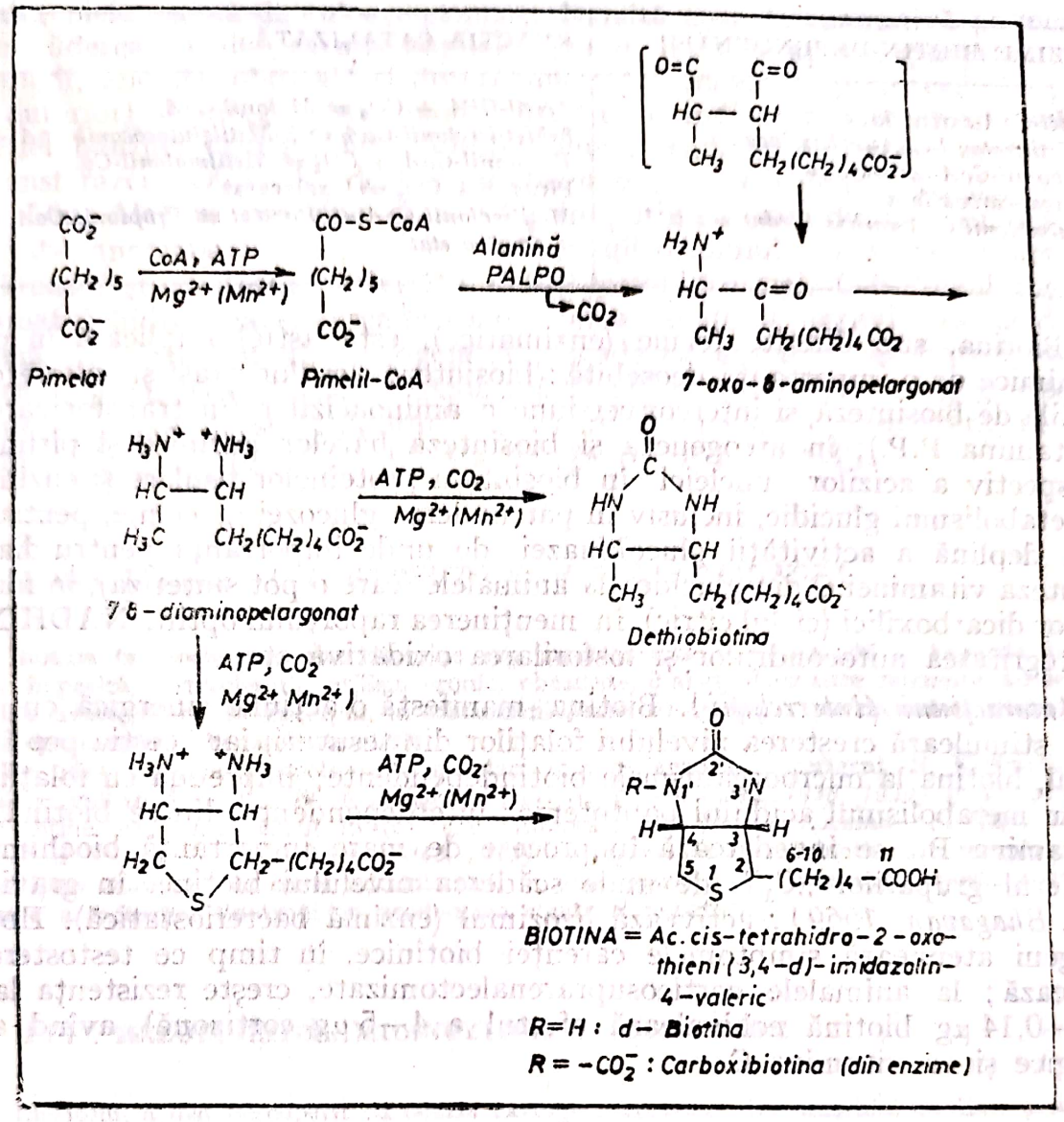


Fig. 2.68. Biosinteza biotinei

µg/g), în rinichi, creier (0,6—0,7); în plămîni, stomac, inimă (0,2) în splină, mușchi (0,06), în ovare, piele (0,02 µg/g) *(R. J. Williams și colab., 1950)*.

După injectarea biotinei marcate (în 4 ore), 16% din radioactivitate se găsește în ficat, 30% în urină și 4% în aerul expirat (CO_2). Eliminarea urinară este de 30—60 µg/zi (scade la 4—7 µg în avitaminoză); eliminarea prin fecale depășește de 3—6 ori aportul alimentar, dovedind sinteza prin flora intestinală.

2.1.12.4. *ROL BIOCHIMIC. INTERACȚIUNI*

Enzimele biotin-dependente („coenzime R") joacă rolul principal în procesele de „carboxilare" (fixarea CO_2, HCO_3^-), în „decarboxilări" și respectiv în transferul grupărilor „C_1" cum rezultă din următoarele exemple:

ENZIME BIOTIN-DEPENDENTE	REACȚIA CATALIZATĂ:
Acetil-CoA-carboxilaza:	*Acetil-CoA* + CO_2 ⇌ *Malonil-CoA*
β-Metilcrotonil-CoA-carboxilaza:	*β-Metilcrotonil-CoA* ⇌ *β-Metilglutacoconil-CoA* + CO_2
Propionil-CoA-carboxilaza:	*Propionil-CoA* + CO_2 ⇌ *Metilmalonil-CoA*
Piruvat-carboxilaza:	Piruvat + CO_2 ⇌ Oxalacetat
Metilmalonil-CoA-carboxil-transferaza	*Metilmalonil-CoA* + *Piruvat* ⇌ *Propionil-CoA* + *Oxaloacetat*

Biotina, sub diferite forme (enzimatice), este astfel implicată în procese biochimice de o importanță deosebită: biosinteza acizilor grași și colesterolului; în căile de biosinteză și interconversiune a aminoacizilor (în transformarea Trp la vitamina P.P.); în ureogeneză și biosinteza bazelor purinice și pirimidinice și respectiv a acizilor nucleici; în biosinteza proteinelor tisulare și enzimatice; în metabolismul glucidic, inclusiv în pătrunderea glucozei în celule, pentru realizarea deplină a activității glucokinazei, de unde importanța pentru diabetici; în sinteza vitaminei C din glucide (la animalele care o pot sintetiza), în formarea acizilor dicarboxilici (ciclul citric), în menținerea raportului optim NADH/NAD^+, în integritatea mitocondriilor și fosforilarea oxidativă etc.

Interacțiuni (interrelații). Biotina manifestă o acțiune sinergică cu acidul folic: stimulează creșterea nivelului folaților din țesuturi, iar aceștia pot înlocui, parțial, biotina la microorganismele biotindependente; împreună cu folații participă în metabolismul acidului pantotenic; interdependența dintre biotină, folați și vitamina B_{12} se invederează în procese de mare importanță biochimică, în transferul grupărilor „C_1" (de unde scăderea nivelului biotinei în graviditate, *H. N. Bhagavan, 1969*); activează lizozimul (enzimă bacteriostatică). Hormonii estrogeni atenuează simptomele carenței biotinice, în timp ce testosterona le agravează; la animalele corticosuprarenalectomizate, crește rezistența la stres (0,07—0,14 μg biotină echivalează efectul a 4—5 μg cortizonă), avînd acțiuni sinergice și cu vitamina C.

2.1.12.5. *AVITAMINOZE. NECESITĂȚI*

Necesitățile se apreciază la 150—300 μg/zi *la om*; 20 la maimuță; 100 la porc; 0,5—3 la șobolan și 0,65—10 μg la puiul de găină. Totuși, avînd în vedere natura regimului alimentar și aportul florei intestinale, necesitățile reale sînt greu de stabilit și de aceea unii vitaminologi susțin, de exemplu, că necesitățile șobolanului sînt de 12—75 ori mai mari decît cele indicate mai sus.

Carența biotinică la animale, produsă prin regim bogat în albuș de ou, lipsa biotinei (și eventual asociate cu administrarea prealabilă a unor antibiotice care inhibă flora intestinală generatoare de biotină) se manifestă prin oprirea creșterii, dermatită descuamantă-seboreică, căderea părului și, uneori, paralizii (*P. György, 1931—1939*); în prelungirea carenței apar tulburări endocrine (de ex. ale testiculului), de osificarea și scădere K^+ (cu 15—20%), ducînd la tulburări neuromusculare.

Avitaminoza umană. Deși la om nu se cunoaște o carență naturală, studiile efectuate pe voluntari cu regim lipsit de biotină și bogat în albuș de ou nefiert (30% din aportul caloric) indică unele manifestări care pot fi atribuite carenței de biotină, deoarece ele cedează la administrarea acesteia. Astfel, paloare, som-

Scanned with OKEN Scanner

nolenţă, piele uscată de culoare cenuşie, dermită uşor descuamativă pe membre, acnee, căderea părului, atrofia papilelor limbii, lipsa de apetit, greaţă, anorexie, hemoragii, anemie, oboseală şi dureri musculare (mialgii), parestezii. În paralel (sau anterior) se înregistrează modificările unor indicatori biochimici: scăderea excreţiei biotinei urinare, hipercolesterolemie, scăderea activităţii ornitil-carbamiltransferazei (OCT) şi, deci a ureogenezei, a încorporării acizilor aminaţi (Met, Leu, Ala) în proteine şi a CO_2 în purine, prin diminuarea activităţii aspartat-transcarbamilazei; scade sinteza glicogenului, cu scăderea activităţii hexokinazei şi creşterea activităţii G-6-P-fosfohidrolazei, G-6-P-dehidrogenazei, glutamat-dehidrogenazei; scade carboxilarea acidului piruvic la acid malic (enzimă implicată în gluconeogeneză); scade capacitatea respiratorie a mitocondriilor (C : 0) şi fosforilarea oxidativă (P : 0) şi, respectiv, energogeneza mitocondrială. Toate aceste tulburări relevă rolul biochimic important al acestei vitamine *(cap. 2.1.12.4)* (*D. W. Martin Jr* şi colab., 1983).

2.1.12.6. *INDICAŢII TERAPEUTICE. HIPERVITAMINOZA*

Biotina în asociere cu alte vitamine sau medicamente, se recomandă în hepatita infecţioasă, ciroză hepatică, ateroscleroză, etilism cronic, obezitate, diabet, dermatite seboreice, acneea rosacee, în bolile neuropsihice, de exemplu, în schizofrenie, scleroze multiple, parkinsonism, distrofii musculare, degenerescenţa hepatolenticulară.

Pe baza efectelor protectoare la şobolan, faţă de agenţii cancerigeni, N, N-dimetilaminoazobenzol = „galben de unt" *(W. Nakahara, K. Chori, T. Huzinova, 1938, 1939)* şi a faptului că nivelul biotinei este mai scăzut în ţesuturile tumorale faţă de cele normale *(F. Kögl, W. Hasslet, 1941, R. A. Pollak, R. J. Williams, 1942, 1943)* s-a sugerat asocierea biotinei în terapia cancerului.

***Hipervitaminoza:* în cazul administrării în doze mari, timp îndelungat, poate apare o antagonizare a factorilor lipotropi cu producerea steatozei hepatice.**

2.1.13. MEZOINOZITOL. MIOINOZITOL. FACTOR BIOS I.

Inozitolul a fost descoperit cu ocazia extragerii creatinei din muşchiul cardiac, precipitînd din soluţiile extractive cu alcool *(J. Scherer, 1850)*, apoi s-a relevat răspîndirea largă a inozitolilor la plante, animale şi microorganisme, atît sub formă liberă cît şi combinată, în special esterificată cu acidul fosforic *(cap. 1.2.4.3)*; s-a considerat că face parte din grupul „Bios" *(Wildiers, 1901)*, reprezentînd factorul „Bios I" cu rol de vitamină antialopecie *(E. V. Eascott, 1928)*. Dintre cei 9 stereoizomeri, cunoscuţi sub termenul generic de „inozitoli", numai mezoinozitolul este activ biologic *(Woolley, 1940)*.

2.1.13.1. *STRUCTURA. PROPRIETĂŢI. DOZĂRI. ANTIVITAMINE*

Mezoinozitolul sau *mioinozitolul* este un ciclohexan-hexaol în care doi —OH, despărţiţi printr-un —OH, se găsesc de-o parte (de exemplu, 4 şi 6) şi ceilalţi patru de cealaltă parte a ciclului *(fig. 2.69)*.

Se prezintă sub formă de pulbere microcristalină albă, fără miros, cu gust dulce, optic activ, cu P.T. 222—225°C; solubil în apă (1 p. în 10 p. apă), puţin solubil în alcool, practic insolubil în eter, acetonă, cloroform (F.R. VIII; nu figurează în R.F. IX). Prin încălzire se transformă în furfurol (similar cu glucidele, în mediu acid); sensibil la U.V.

Identificarea se poate face prin oxidare nitrică, în prezenţa unor săruri, de exemplu, azotit acid de Hg: coloraţie roşie-portocalie *(reacţia Scherer)*; cu H_2O_2, în prezenţă de sulfat feros, dă o coloraţie albastră-violetă; cu permanganatul sau acidul cromic eliberează CO_2.

Scanned with OKEN Scanner

Dozarea pe preparate pure (sau după izolare) se poate efectua în prezență de periodat de sodiu în mediu acid, bicromat de K, arsenit de Na în exces și IK, prin titrare cu iod (metoda *Fleury-Joly*, adoptată, cu unele modificări, și în F.R. VIII).

Dozarea din urină impune separarea de compușii înrudiți (sorbitol) prin metode adecvate: cromatografia pe hîrtie cu sistem de irigare: metanol: apă (9 : 1) sau fenol: apă sau prin trecere pe coloane cu schimbători de ioni, cînd trece în extractul urinar dezionizat *(Courtois, Malangeau, Perlès, Helleu, 1956)* și aplicarea unei metode chimice sau microbiologice.

Metodele cele mai specifice urmăresc creșterea *Saccharomyces cerevisiae (Wooley, 1941); Schizosaccharomyces Pombè*, dar mai ales *Neurospora crassa mutantul „inositolles"*, obținut prin iradiere cu raze X *(Schopfer)*.

Testele biologice urmăresc vindecarea alopeciei la șoarecii carențați în mezoinozitol.

Antivitamine. Izomitilul și derivații săi cu I sau Br inhibă efectul de creștere al mezoinozitolului pe *Neurospora crassa*, iar γ-hexaclor-ciclohexanul pe *Sacch. cerevisiae*.

2.1.13.2. *METABOLISM*

Majoritatea microorganismelor (mai ales gram-negative), de exemplu, *Proteus vulgaris, Pseudomonas fluorescens* etc., sintetizează mezoinozitolul (1—2 mg/g masă uscată). În plante, în special sub formă de ester hexafosforic, *acidul fitic* și sărurile sale de Ca, Mg, denumite *fitine*, constituie componenți normali ai parenchimului vegetativ și al organelor foliacee, mai ales în părțile în creștere. În corpul omului și animalelor se găsesc, de asemenea cantități mari, dar nu se știe în ce măsură acestea provin prin aportul alimentar, din flora intestinală sau prin biosinteza endogenă.

Între mezoinozitol și glucide apar foarte strînse corelații reciproce *(fig. 2.69)*. În biosinteză, o parte (mică) din radioactivitatea glucozei marcată, administrată șobolanului, se regăsește în mezoinozitol, sugerînd o biosinteză endogenă (care însă nu asigură necesitățile). În catabolism, o parte din radioactivitatea mezoinozitolului marcat, injectat șobolanului cu diabet experimental (prin fluorizină), apare în glucoză. Se apreciază că, în condiții normale, aproximativ 70% din mezoinozitol se transformă în glucide. O cale importantă la mamifere este scindarea oxidativă la *acid glucuronic*, sub efectul unei oxigenaze care are Fe^{2+} drept cofactor (izolată din rinichi). D-glucuronatul astfel format este antrenat pe calea glucuronat-xiluloză-pentozofosfați și poate servi la formarea acidului ascorbic la animalele care sintetizează vitamina C *(F. C. Charalampous și colab., 1957, 1964; S. Hollmann, O. Touster, 1964; T. Posternak, W. H. Schopfer, D. Reymond, 1955, 1958)*.

Absorbția, similară cu a ozelor, are loc la nivelul intestinului subțire, mai ales sub formă de inozit-monofosfat. De aici trece în circulație (0,36—0,72 mg/100 ml) și se depozitează în diferite organe (în mg/100 g); creier (162,6), rinichi, stomac (126), ficat (86,4), testicul (68,9), ovar (61,2), inimă (54,9), mușchii scheletici (42,6 mg); în mușchi se găsește și sub formă liberă, în mitocondrii și microzomi. Concentrațiile mult mai mari din țesuturi față de sînge se explică prin transportul ciclitolilor în celule contra gradientului de concentrație, pe baza unui mecanism de transport Na^+ și energodependent, ilustrat pe feliile de țesuturi *in vitro (G. Hauser, 1965)* și, probabil, prin deplasarea echilibrului formelor libere spre combinațiile acestora de depozitare și respectiv prin compartimentarea subcelulară.

Eliminarea se face prin urină, care conține cantități relativ mici: 12—56 mg/litru, la adult, și 8—30 mg/litru, la copil. Aceasta se explică prin capacitatea reabsorbției tubulare și existența unui „prag" plasmatic (la fel ca în cazul

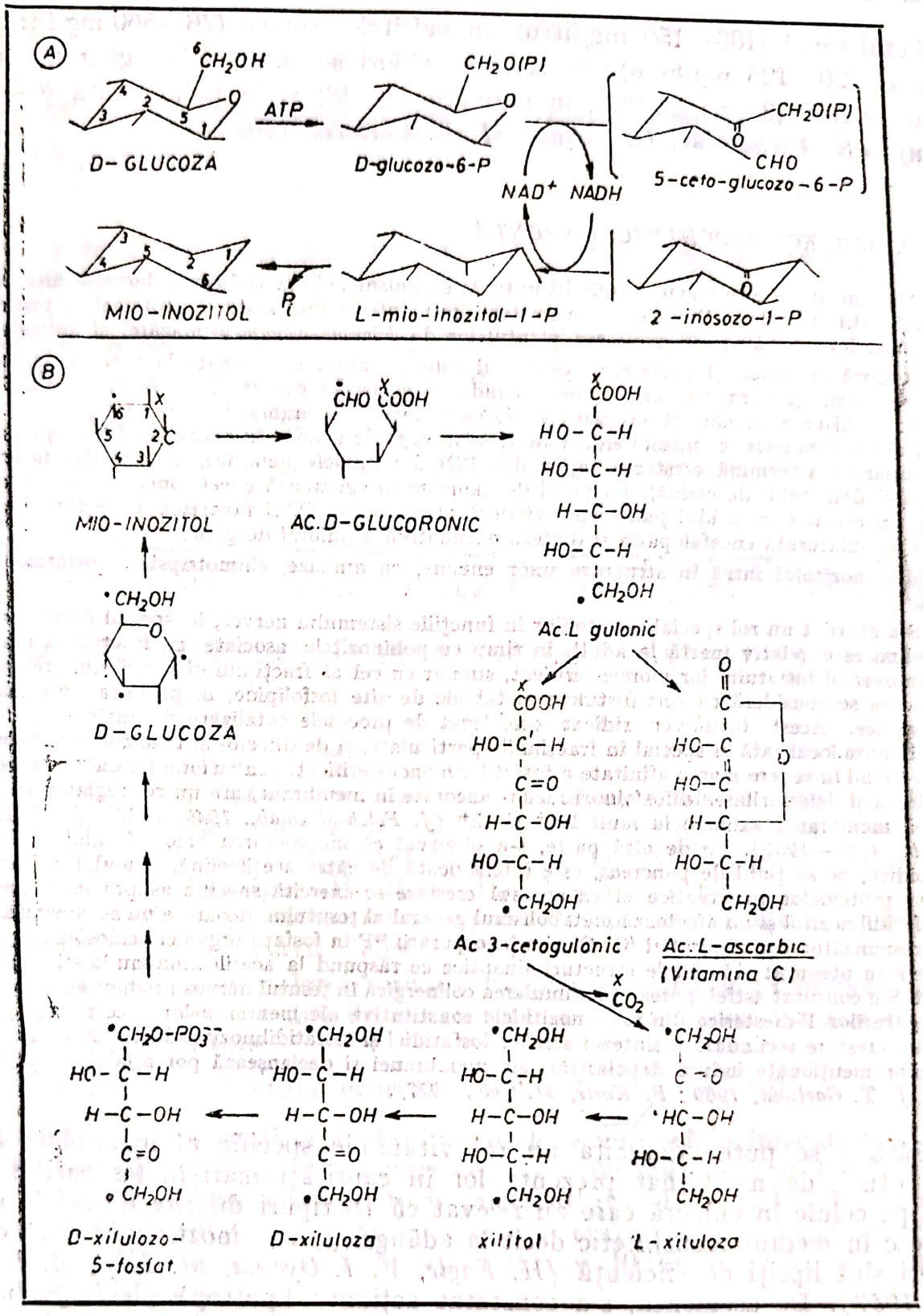


Fig. 2.69. Căile de biosinteză (A) şi de catabolism (B) ale mioinozitolului (după F. Korte, M. Goto, 1977)

glucozei). Cînd acest prag este depăşit sau cînd reabsorbţia tubulară este diminuată se elimină cantităţi mai mari prin urină, ducînd la un adevărat „diabet inozitolic" ca de exemplu în diabetul pancreatic (zaharat) (15—340 mg/litru; după unele date, chiar 4 g/litru, respectiv 15—20 g/zi, însoţind glicozuria), în

diabetul renal (100—150 mg/litru), în nefritele cronice (26—560 mg/litru) şi în nefroze (20—125 mg/litru); în schimb, valori scăzute, se înregistrează în diabetul insipid (3—5 mg/litru), în miopatii (3—48) şi în poliomielită (6—10 mg/litru) *(R. Perlès, M. C. Collas; J. E. Cortois, 1964)*.

2.1.13.3. *ROL BIOCHIMIC. CARENŢĂ*

Mezoinozitolul este foarte răspîndit în toate organismele în stare liberă, dar mai ales sub formă de combinaţii fosforilate. Este factor de creştere (prin intermediul sintezei proteinelor) pentru microorganisme, levuri, plante (dezvoltarea plantulelor de *Pisum sativum* = mazăre) şi animale.

Asigură creşterea şi protejează şobolanul faţă de alopecie; carenţa la şoarece determină încetarea creşterii şi dermatite grave, menţionîndu-se ca aspect caracteristic căderea părului în jurul ochilor: „ochi cu monoclu" şi alopecie; scăderea lactaţiei. La animalele în creştere, cu un *turn-over* ridicat al fosfolipidelor, manifestă efecte antagoniste faţă de colină; în exces, inhibă creşterea şobolanului tînăr şi determină creşterea raportului P/N din lipidele hepatice, cu apariţia ficatului gras (indiciu al deficitului de colină). La puiul de găină se înregistrează encefalomalacie şi diateză exsudativă. În asociere cu acidul pantotenic vindecă alopecia; cu PAB favorizează creşterea, iar cu vitamina E înlăturată encefalopatia şi diateza exsudativă a puiului de găină.

Mezoinozitolul intră în structura unor enzime, ca amilaze, chimotripsină, fosfataza alcalină, renina.

S-a acordat un rol special inozitolilor în funcţiile sistemului nervos, în special după constatarea că mielina este relativ inertă la adult, în timp ce poliinozitele asociate cu fracţiunea mielinei au un turn-over al fosfatului lor monoesterificat, similar cu cel al fracţiunii obţinută din creierul întreg şi de aceea se consideră că sînt distincte metabolic de alte fosfolipide, în privinţa grupărilor fosfomonoesterice. Acest turn-over ridicat este legat de procesele catalizate de enzime ca fosfatidilinozitolkinaza localizată în special în fracţiunile particulate, şi de difosfo- şi trifosfoinozitidkinaze, din citosol. Avînd în vedere marea afinitate a fosfaţilor monoesterificaţi pentru ionii de Ca^{2+} se sugerează că fosforilarea şi defosforilarea difosfoinozitidelor, ancorate în membrane, are un rol reglator în permeabilitatea membranei axonale la ionii Na^+ şi K^+ *(J. Folch şi colab., 1949, 1952; J. N. Hawthone şi colab., 1966—1969)*. Pe de altă parte, s-a observat că încorporarea ortofosfatului în fracţiunea fosfolipidică, pe secţiuni de pancreas, este intensificată de către acetilcolină, stimulator fiziologic al secreţiei proteinelor pancreatice şi că această creştere se exercită specific asupra *turn-over*-ului P din fosfatidilinozitol şi nu afectează metabolismul general al ţesutului, deoarece nu se constată o creştere corespunzătoare a respiraţiei (C : O) şi a încorporării ^{32}P în fosfaţii organici acidosolubili; creşteri similare s-au observat şi în unele structuri sinaptice ce răspund la acetilcolină sau la stimulii preganglionari. S-a conturat astfel ipoteza că stimularea colinergică în ţesutul nervos produce accelerarea scindării legăturilor P-diesterice din fosfoinozitidele constitutive ale membranelor; acest efect „primar" duce la o creştere secundară a sintezei acizilor fosfatidici şi fosfatidilinozitolului; stimularea scindării legăturilor menţionate induce depolarizări ale membranei şi declanşează potenţialul de acţiune *(J. Durell, J. T. Garland, 1969; F. Korte, M. Goto, 1977)*.

Fără a se putea delimita un rol vitaminic specific al inozitolilor la *om*, sînt, totuşi, de menţionat prezenţa lor în cantităţi mari în ţesuturi şi cercetările pe celule în cultură care au relevat că 18 tipuri diferite de celule umane nu cresc în mediul semisintetic decît la adăugarea mezoinozitolului şi că ceilalţi izomeri sînt lipsiţi de eficienţă *(H. Eagle, V. I. Oyama, M. Levy, A. E. Freeman, 1957)*. De asemenea, s-a constatat acţiunea lipotropă (de împiedicare a degenerescenţei grase a ficatului) prin efectul formei libere şi/sau a combinaţiilor, asupra colesterolului (evitarea depozitării excesive în ficat) şi prin stimularea transportului lipoproteinelor cu densitate foarte mică din ficat în circulaţie *(S. H. Hasan, A. Kotaki, K. Yagi, 1970)*; stimulează funcţiile cardiace; creşte diureza şi creatinuria şi pare necesară dezvoltării normale a părului, deoarece firul de păr de la persoanele cu calviţie (chelie) conţine cantităţi mai mici decît firul de păr normal.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.13.4. *INDICAȚII TERAPEUTICE*

Preparatele care conțin mezoinozitol, *Tonositul* se recomandă în insuficiențele hepatice, ciroze, întîrzieri în creștere, convalescențe, anemii, ateroscleroză, astenie, în intoxicații cu hepatotoxice (cu excepția tetraclorurii de carbon).

2.1.14. ACIDUL PARAAMINOBENZOIC. PAB. PABA. FACTOR B_x. VITAMINA H' SAU H_2. GEROVITAL H_3. ASLAVITAL

Acidul p-aminobenzoic este cunoscut și sintetizat de mult timp *(Fischer, 1863)*; mult mai tîrziu a fost considerat ca o vitamină din grupul B, sub denumiri diferite: *factor de stimulare al creșterii puiului de găină, factor de prevenire a acromotrichiei* (decolorarea părului), respectiv *factor trichromogen (Ausbacher, 1941), factorul P de creștere bacteriană, factor* B_x, *Vitamina H', vitamina* H_2. A beneficiat de o atenție specială în urma demonstrării antagonismului cu sulfamidele *(Wood, Fildes, 1940)*, care stă la baza chimioterapiei moderne și a participării sale în structura vitaminelor din grupul folic și folinic *(cap. 2.1.15)*.

2.1.14.1. *STRUCTURA. RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANTIVITAMINE*

Acidul paraaminobenzoic (PAB, PABA) are următoarea structură:

$$H_2N-C_6H_4-COOR, \text{ în care } R=H.$$

Înlocuirea R cu diferiți radicali conduce la compuși cu largi aplicații în terapie, în special în anestezie. $R = -C_2H_5$: anestezina; $R = -CH_2-CH(CH_3)_2$: cicloform; $R = -(CH_2)_3-CH_3$: butezina; $R = -CH_2-C(CH_3)_2-CH_2-N(C_2H_5)_2$: larocaina; $R=-CH(CH_3)-CH(CH_3)-CH_2-N(CH_3)_2$: tutocaina; $R = -CH_2-CH_2-N(C_2H_5)_2$: *novocaina* sau *procaina*, principiul activ fundamental al gerovitalului H_3 și Aslavit *(Ana Aslan)*.

Cercetări asupra unei largi serii de izomeri ai acidului aminobenzoic și a unor compuși înrudiți, pe diferite microorganisme, au relevat interesante corelații „structură-activitate".

Sulfamidele, cu structura generală: $H_2N-C_6H_4-SO_2NH-R$, prezintă o mare asemănare structurală cu PAB (diferențele se constată în înlocuirea $-COOH$ cu $-SO_2NH-R$) și manifestă puternice efecte de *antivitamine PAB*. Efectul a $3{,}03 \times 10^{-4}$ M sulfanilamidă poate fi înlăturat prin $1{,}2 - 5{,}7 \times 10^{-8}$M PAB; cu alte cuvinte, pentru a-și exercita efectele terapeutice (antimicrobiene) sînt necesare cantități de sulfamidă de aproximativ 10.000 ori mai mari față de PAB *(cap. 2.1.15.2)*.

2.1.14.2. *PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE*

Acidul p-aminobenzoic se prezintă sub formă de cristale incolore sau pulbere cristalină albă sau slab gălbuie (culoarea se accentuează la aer și lumină), fără miros, cu gust slab acru-amar; P.T. 186°—189°C; este solubil în 200 p. apă, 8 p. alcool, 50 p. eter, în soluții de hidroxizi și carbonați alcalini; puțin solubil în cloroform.

Scanned with OKEN Scanner

Identificare : în prezență de HCl 10%, azotit de sodiu 10% și β-naftol apare o colorație și se formează un precipitat roșu-portocaliu (F.R. IX).

Izomerii PAB pot fi recunoscuți prin următoarele reacții :

Izomeri PAB	$K_4Fe(CN)_6$	$K_3Fe(CN)_6$	$Na_2Fe(CN)_2 \cdot NO$
p-aminobenzoic	brună	verde-albastră	brun-galbenă
m-aminobenzoic	violetă	fără culoare	idem
o-aminobenzoic	fără culoare	idem	brun-roșie

Metodele de dozare se bazează, mai ales, pe reacții de cuplare — diazotare cu diferite amine aromatice, de exemplu cu diclorhidrat de N-1-naftiletilen-diamină sau cu p-dimetilaminobenzaldehidă, aplicabile pe mediile biologice (ex. sînge), dar sînt lipsite de specificitate (interferează, de exemplu, cu compușii indolici).

Metodele cromatografice, în diferite variante, permit separarea de compușii înrudiți, ca acidul p-aminosalicilic (PAS), p-amino-hipuric (PAH), de acizii o- și m-aminobenzoici etc.

Metodele microbiologice sînt preferate datorită specificității și sensibilității lor mai mari decît a metodelor fizico-chimice ; în acest scop servesc *Lactobacillus arabinosus 17—5, Leuconostoc mesenteroides, Acetobacter suboxydans ATCC—621* și, în special, *Neurospora crassa.*

Testele biologice urmăresc prevenirea sau vindecarea acromotrichiei carențiale la șoarece, șobolan, pisică, dar ele nu sînt suficient de specifice pentru dozările de precizie.

2.1.14.3. *METABOLISM. ROL BIOCHIMIC. CARENȚĂ*

Unele microorganisme sintetizează PAB ; pentru unele este factor necesar creșterii *(L. arabinosus, E. coli, Acetobacter suboxydans)*, în timp ce la altele, în concentrații ridicate, oprește dezvoltarea (ex. *Mycobacter tuberculosis).*

Este prezent în țesuturile umane și animale, în stare liberă, în structura acizilor folici și folinici și legat de proteine, mai ales în ficat și mai puțin în rinichi, mușchi, creier ; se elimină pe cale renală (0,3—1,3 mg/zi).

Avitaminoza experimentală, caracterizată prin acromotrichie (decolorarea părului) se poate realiza prin carență alimentară, și, în special prin administrarea sulfamidelor (antivitamine și inhibitori ai florei intestinale [PAB-generatoare).

Importanța PAB rezultă din participarea sa în structura vitaminelor folice-folinice *(cap. 2.1.15)*, din protejarea AGE și vitaminei E față de oxidare *(cap. 2.1.4* și *2.1.5) ;* din protejarea pielii față de radiațiile solare și, în terapie, din antagonismul „PAB-sulfamide".

2.1.14.4. *INDICAȚII TERAPEUTICE. TOXICITATE. GEROVITAL H_3. ASLAVITAL*

PAB este indicat în sclerodermie, dermatomiozite, dermatită herpetiformă, în sindroamele alergice (urticarie, prurit, boala serului), în depigmentarea părului (încărunțire ; acromotrichie nutrițională, în doză de 0,25 mg/zi), artrite reumatismale (în asociere cu agenți terapeutici : salicilați, cortizonice), în ricketzioze, tifos exantematic.

Dozele mari au efecte toxice : greață, vărsături, febră, acidoză, afectarea ficatului, reacții secundare (erupții) iatrogene.

Gerovital H_3, avînd ca principiu activ procaina-HCl și respectiv *Aslavital*, cu adaus de factor antiaterogen și activatori, elaborate după concepția acad. prof. dr. *Ana Aslan* în variate forme farmaceutice, reprezintă factori eutrofic-regeneratori cu acțiune biocatalitică celulară și de reglare a metabolismului lipidelor și colesterolului, cu efect lipotrop, antiaterogen și de ameliorare a circulației

cerebrale şi a metabolismului celulei nervoase; vasodilatator coronarian şi periferic, spasmolitic. Datorită acestor acţiuni se recomandă profilactic şi curativ în formele de îmbătrînire predominant cerebrale şi cardiovasculare, în astenia psihică şi fizică, surmenaj intelectual, tulburări de memorie şi concentrare a atenţiei, stări de depresie şi hiperemotivitate la vîrstnici şi adulţi; în ateroscleroza generalizată sau cu predominanţă cerebrală, coronariană sau periferică (arterite); în prevenirea şi combaterea accidentelor trombo-embolice şi a sechelelor posthemoragice; la copii, în sindromul subdezvoltării psiho-somatice şi în sechelele encefalomielitice.

VITAMINE ANTIANEMICE

2.1.15. ACIZII FOLICI ŞI FOLINICI. FOLACINA. VITAMINA B_c, M, U SAU R. FACTOR „SLR" SAU „CF". NORIT-ELUAT-FACTOR. COENZIMA C

În cadrul grupului vitaminelor B, s-a izolat din drojdia-de-bere un factor antianemic *(L. Wills B. S. Lond, 1931)*, activ şi pe maimuţă, de unde denumirea de *vitamina M* (M = monkey = maimuţă) *(P. Day, W. C. Langeston, W. J. Darby, 1938)* şi pe găini, denumit *vitamina U (E. L. R. Stockstand, P. D. V. Manoring, 1938)*. Din ficat s-a obţinut un factor de creştere pentru L.casei, izolat prin adsorbţie pe cărbune activ (norit) şi eluare cu alcool-amoniacal, de unde denumirile de *factor Lactobacillus casei* sau *norit-eluat-factor (E. E. Snell, W. H. Peterson, 1939, 1940)* şi cu proprietăţi antianemice pe puiul de găină, denumit *vitamina* B_c (c = chick = pui de găină) *(A. G. Hodgkin, E. M. Parrott, 1940)*. Din frunzele de spanac s-a izolat *acidul folic (H. K. Mitchell, E. E. Snell, R. J. Williams, 1941)*. Ulterior s-a constatat că factorii obţinuţi de către diferitele grupe de cercetători din drojdie, microorganisme, ficat şi spanac fac parte din aceeaşi grupă şi s-a propus denumirea generică de *acizi folici (tabelul 2.7)*. Stabilirea structurii chimice *(E. L. Wittle, B. L. O'Dell, J. M. Vandenbelt, J. J. Pfiffner, 1945)*, confirmată prin sinteză *(R. B. Angier, 1945)* a relevat că în componenţa acidului folic intră unii pigmenţi cu structură de pteridine izolaţi anterior din aripile fluturilor *(F. G. Hopkins, 1889; H. Wieland, C. Schöpf, 1925)*, cu structura cunoscută *(R. Purrmann, 1940)* şi acidul para-aminobenzoic (PAB). În continuare, au fost izolaţi o serie de factori înrudiţi, din ficatul de oaie şi şobolan: 28 de compuşi diferiţi *(W. S. Osborne-White, R. M. Smith, 1973)*, dintre care o importanţă deosebită prezintă acizii folinici *(W. Shive, 1948)*, care constituie coenzime implicate în reacţiile metabolice *(tabelul 2.7)*.

2.1.15.1 *STRUCTURA ŞI CARACTIZAREA GRUPULUI FOLIC ŞI FOLINIC*

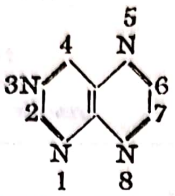
Grupul *acidului folic* are la bază structura de *pteridină*, asociere a unui ciclu pirimidinic cu unul pirazinic şi anume: pirimido-(4,5b)-pirazona sau pirazin-(2,3d)-pirimidina, sub forma *pterinei:* 2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridina, care împreună cu acidul para-aminobenzoic (PAB) formează *acidul pteroic* (Pte). Prin ataşarea unui rest de acid glutamic se obţine *acidul pteroil-monoglutamic* (Pte-Glu) identic cu *acidul folic (tabelul 2.7)*. Prin ataşarea unor noi resturi de Glu, prin legături γ, se obţin: *diopterina* ($Pte\text{-}Glu_2$), *teropterina* ($Pte\text{-}Glu_3$), *vitamina* B_c *conjugată* ($Pte\text{-}Glu_7$). Se cunosc şi alţi derivaţi, ca acizii N^{10}-metil-, N^{10}-formil-folici etc. *(fig. 2.70)*

Grupul *acizilor folinici* conţine o serie de compuşi care au unul din ciclii saturat, cum este *acidul folinic* (FH_4), acidul 5-formiltetrahidrofolic ($N^5—CHO—FH_4$) *(tabelul 2.7; figura 2.70)* care constituie partea de coenzimă (activă) a enzimelor folinice.

Caracterizarea compuşilor din grupul acizilor folici. *Pteridinele* au fost identificate în pigmenţii aripilor fluturilor, pe baza fluorescenţei intense în U.V. *(Hopkins, 1889—1893)* şi, ulterior, au fost izolate o serie de pteridine (xanto-

TABELUL 2.7

Caracterizarea vitaminelor folice şi folinice

DENUMIREA	STRUCTURA	AUTOR	SURSA	ACŢIUNE
PTERIDINA				Ciclu de bază
PTERINA	2-amino-4-hidroxi-6-metil-pteridina	HOPKINS (1889—93)	aripi fluturi	fluorescenţă în U.V.
AC. PTEROIC Pte-	N-(2 NH_2, 4OH)-pteridil-6-yl-metil-PAB			L. casei: (—) Antianem.: (—)
RHIZOPTERINA SLR-FACTOR	N-10-metil-pteroic N-10-formil-pteroic		Rhisopus niger	Str. lact. R. (+) L.cas. (—)
L. CASEI FACTOR	Pteroil-glutamic	Snell (1939)	ficat	L.cas. (+)
NORIT-ELUAT-FACTOR	Pteroil-glutamic	Peterson (1939)	drojdie	Antianemic creştere pui
ACID FOLIC	Pteroil-glutamic	Mitchel, Snell, Williams (1941)	spanac	L.cas. (+)
IDENTITATEA	Pteroil-glutamic *Pte-Glu* (vezi structura)	Stockstand Pfiffner, Subarow, Smithe (1945—46)	ficat, spanac, drojdie	antianem. pui; factor de creştere pt. microorganisme
	N^{10}-CHO-Pte-Glu	Rouen (1952)		
DIOPTERINA	$Pte\text{-}Glu_2$			
TEROPTERINA	$Pte\text{-}Glu_3$		Corine-bact.	L.cas. (+) Str. faec. (—) antian, pui
B_c (conjugată)	$Pte\text{-}Glu_7$	Hogan, Parat (1940)	ficat, drojdie	antianemic; slab pe microorganisme
ACID FOLINIC CITROVORUM FACT. „CF"	Ac.5-formil-5,6,7,8-tetrahidro-Pte-Glu 5-CHO-FH_4	Shive (1948)	ficat	Necesar pt. Leuconostoc citrovorum
LEUCOVORINA FACT. SINTETIC „SF"	Idem (racemic)		sinteză	Mai puţin activ decît „CF" (antipozi)
ACID PREFOLINIC	5-metil-tetrahidrofolic= 5-CH_3—FH_4	Donaldson	ficat	L.cas. (+) Str. faec. (—)

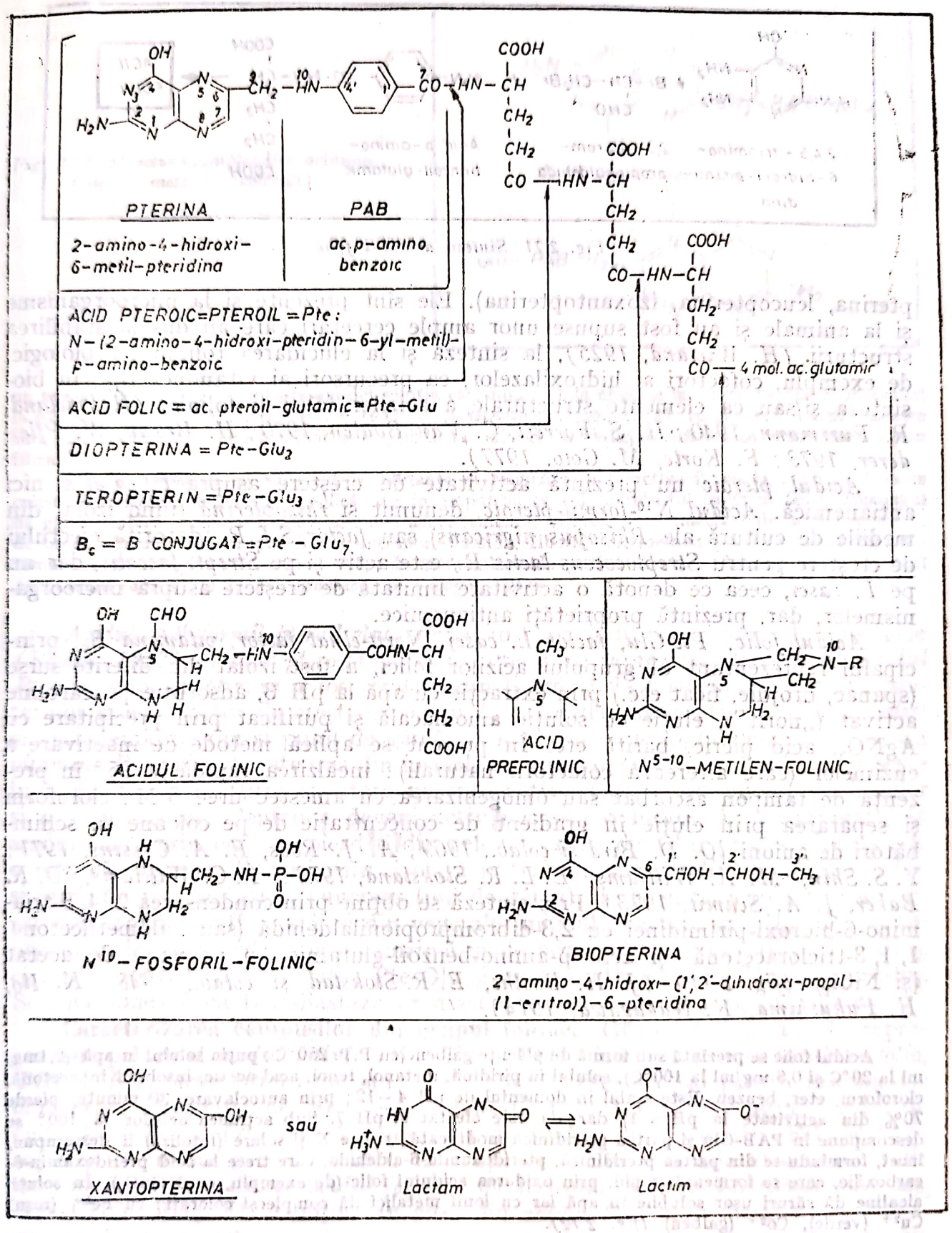


Fig. 2.70. Structura compușilor din grupa acidului folic, folinic și înrudiți

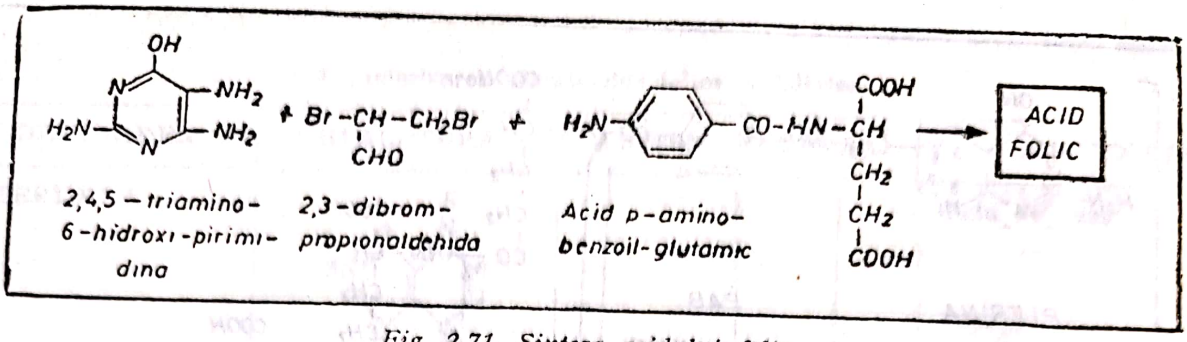


Fig. 2.71. Sinteza acidului folic

pterina, leucopterina, izoxantopterina). Ele sînt prezente şi la microorganisme şi la animale şi au fost supuse unor ample cercetări care au dus la stabilirea structurii *(H. Wieland, 1925)*, la sinteza şi la elucidarea rolului lor biologic, de exemplu, cofactori ai hidroxilazelor, ca precursori ai vitaminei B_{12}; în biosinteza şi/sau ca elemente structurale a acizilor folici şi folinici *(H. Wieland, R. Purrmann, 1940; H. S. Forrest, C. Van Baalen, 1970; H. Braun, W. Pfleiderer, 1973; F. Korte, M. Goto, 1977)*.

Acidul pteroic nu prezintă activitate de creştere asupra *L. casei* şi nici antianemică. *Acidul N^{10}-formil-pteroic*, denumit şi *rhizopterină* (fiind izolat din mediile de cultură ale *Rhisopus nigricans*) sau *factor S.L.R.*, datorită efectului de creştere pentru *Streptococcus lactis R*; este activ şi pe *Strept. faecalis*, dar nu pe *L. casei*, ceea ce denotă o activitate limitată de creştere asupra microorganismelor, dar, prezintă proprietăţi antianemice.

Acidul folic, Pte-Glu, factor L. casei, Norit-eluat factor, vitamina B_c, principalul reprezentant al grupului acizilor folici, a fost izolat din diferite surse (spanac, drojdie, ficat etc.) prin extracţie cu apă la pH 3, adsorbţie pe cărbune activat („norit"), eluţie cu soluţie amoniacală şi purificat prin precipitare cu $AgNO_3$, acid picric, barită etc. În prezent se aplică metode de inactivare a enzimelor (care alterează cofactorii naturali): încălzirea rapidă la 95° în prezenţă de tampon ascorbat sau omogenizarea cu amestec uree 6 M: cloroform şi separarea prin eluţie în gradient de concentraţie de pe coloane cu schimbători de anioni *(O. D. Bird şi colab., 1969; A. J. Roos, E. A. Cossins, 1971; Y. S. Shin, M. A. Williams, E. L. R. Stokstand, 1972; R. C. Williams, D. R. Baker, J. A. Schmit, 1973)*. Prin sinteză se obţine prin condensarea 2, 4, 5-triamino-6-hidroxi-pirimidinei cu 2,3-dibrompropionilaldehidă (sau halometilcetone, 1, 1, 3-tricloracetonă) şi acid p-amino-benzoil-glutamic, în prezenţă de acetat (şi $NiCl_2$) *(fig. 2.71)* *(J. H. Boothe, E. R. Stokstad şi colab., 1948; K. Ito, H. Fukushima, K. Nakagawa, 1974)*.

Acidul folic se prezintă sub formă de plăcuţe galbene cu P.T. 250 °C; puţin solubil în apă (0,1mg/ml la 20 °C şi 0,5 mg/ml la 100 °C), solubil în piridină, metanol, fenol, acid acetic, insolubil în acetonă, cloroform, eter, benzen. Este stabil în domeniul de pH 4—12; prin autoclavare, 30 minute, pierde 70% din activitate la pH = 1, dar nu este afectat la pH 7. Sub acţiunea acizilor la 100° se descompune în PAB-Glu şi partea pteridinică modificată; razele X şi solare (fotoliză) îl descompun, încet, formîndu-se din partea pteridinică, pteridoxamin-6-aldehida, care trece la acid pteridoxamin-6-carboxilic, care se formează, rapid, prin oxidarea acidului folic (de exemplu, cu $KMnO_4$). În soluţii alcaline dă săruri uşor solubile în apă iar cu ionii metalici dă complecşi coloraţi: cu Fe^{3+} (roşu) Cu^{2+} (verde), Co^{2+} (galben) *(fig. 2.72)*.

În *aplicaţiile farmaceutice* trebuie să se ţină seama de faptul că solubilitatea în apă, foarte mică, poate creşte prin adăugarea glicocolului (10%) sau prin încălzire la 75 °C, cînd se solvă 0,5‰ acid folic; soluţia saturată are pH = 4,0 — 5,0 şi este stabilă cîteva săptămîni, după care depune

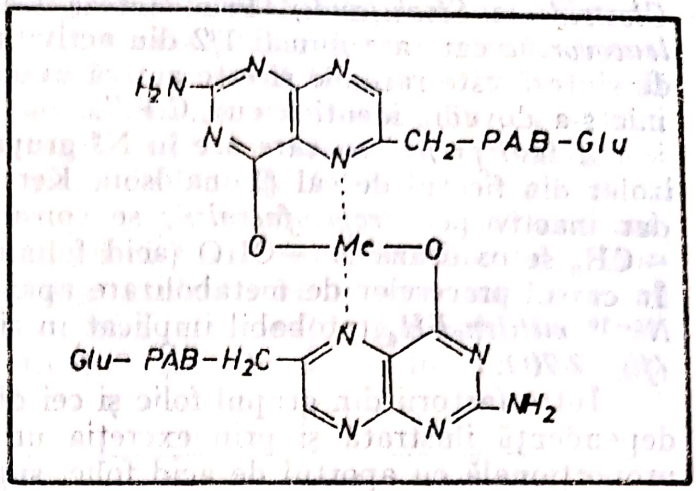


Fig. 2.72. Structura complecşilor acidului folic cu metalele (colorați)

un precipitat; în prezența nicotinamidei soluția este mai stabilă chiar și în prezența ciancobalaminei la pH = 6,0 *(A. Taub, H. Heberman, 1953; S. Scheindin și colab., 1952)*. În general, soluțiile neutre sînt mai stabile, cele alcaline mai susceptibile la oxidare, iar soluția sării sodice se sterilizează prin filtrare.

Este *incompatibil* cu substanțele oxidante și reducătoare (inactivări), cu ionii de Ca^{2+} (sare calcică insolubilă); în soluție alcoolică este incompatibil cu: cloralhidratul, sulfatul feros, mucilagul de gumă arabică, preparate acide, siropuri acide (zmeură, vișine). Este inactivat de acidul ascorbic, de unele vitamine din grupul B, de exemplu, tiamina, riboflavina (pentru protejare se recomandă tampoane citrat-fosfat pH = 6,0 — 9,8); de către sulfamide (sulfadiazină), și de către antimetaboliți *(a se vedea cap. 2.1.15.2) (V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Acidul N^{10}-formil-pteroil-glutamic a fost obținut din produsele biologice *(Rauen, 1952)*. *Acidul pteroildiglutamic* (Pte-Glu_2) reprezintă *diopterina*. *Acidul Pte-Glu_3* sau *teropterina* a fost izolată din lichidele de fermentație a corinebacteriilor și este factor de creștere pentru *L. casei* (dar nu pentru *Strept. faecalis*) și antianemic pe om și puiul de găină. *Acidul pteroil-heptaglutamic, Pte-Glu_7* sau *vitamina B_c conjugată* este una din formele majore sub care acidul folic se găsește în alimente și țesuturi; ca atare nu este activ în creșterea microorganismelor și nici în anemie. Pentru a deveni activ necesită o hidroliză (deconjugare) la acidul folic, prin care se pierd 6 din cele 7 resturi de Glu, proces efectuat de o enzimă, *vitamin B_c-conjugaza*, izolată inițial din ficat *(Bird și colab., 1945)* și apoi din rinichi (porc), pancreas (pui de găină), de la gîște (care au o activitate puternică la pH_{opt} 4,5) și din vegetale (migdale, cartofi, cu pH_{opt} 7). Microorganismele nu posedă această enzimă și de aceea ele nu pot utiliza Pte-Glu_7, ci numai formele deconjugate: Pte-Glu și unele dintre ele Pte-Glu_2 și Pte-Glu_3. Se menționează că takadiastaza ar avea o acțiune similară B_c-conjugazei.

Caracterizarea compușilor din grupul folinic. Grupul folinic are ca reprezentant principal *acidul folinic (W. Shive, 1948)*, denumit și *acid tetrahidrofolic, THFA, FH_4 factor citrovorum* sau „CF" deoarece este necesar pentru *Leuconostoc citrovorum* (creșterea de 50% este asigurată prin $1{,}8 \times 10^{-5}$ μg/ml mediu de cultură). Este de precizat că denumirea de *acid folinic*, respectiv FH_4 se folosește și ca nume generic pentru derivații cu ciclul pirazinic al acidului folic saturat și că în realitate *acidul folinic este derivatul N^5-formil-tetrahidrofolic sau N^5—CHO—FH_4*. El se obține *in vitro* din acidul folic prin formilare și hidrogenare la temperatură ridicată în prezență de acid ascorbic și *in vivo* sub acțiunea piridinnucleotidfolat-reductazei, în prezența acidului ascorbic, în două etape; ca intermediar se formează *acidul dihidrofolic* sau FH_2, izolat inițial din

Clostridium Stockstandii. Prin sinteză s-a obținut *factorul sintetic*, „*S.F.*" sau *leucovorina* care are numai 1/2 din activitatea „C.F." natural, deoarece produsul de sinteză este racemic și este activă numai forma L(—), care izolată din racemic s-a dovedit identică cu „C.F.".

Acidul prefolinic, care are în N^5 gruparea $-CH_3$ (în loc de —CHO) a fost izolat din ficatul de cal (Donaldson, Kerestesy, 1959) și este activ pe *L. casei*, dar inactiv pe *Strept. faecalis*; se consideră ca un precursor, a cărui grupare $-CH_3$ se oxidează la —CHO (acid folinic) în prezența FAD sau vitaminei K. În cursul proceselor de metabolizare apar și alți produși intermediari, ca *acidul* N^{5-10} *metilen-*FH_4 (probabil implicat în sinteza ADN) și *acidul* N^{10}*-fosforil-*FH_4 *(fig. 2.70)*.

Între factorii din grupul folic și cei din grupul folinic există o strînsă interdependență ilustrată și prin excreția urinară a unor cantități de acid folinic proporțională cu aportul de acid folic, sugerînd transformarea acestuia în țesuturi (ficat) și în mucoasa intestinală. Acidul folinic reprezintă partea activă a *coenzimelor de formilare* sau „*CoF*" și sub această formă are o eficiență de 10—100 ori mai mare decît acidul folic, argumentînd astfel necesitatea convertirii prealabile a acizilor folici în folinici.

2.1.15.2. *RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANALOGI ACTIVI ȘI ANTIVITAMINE (PAB ȘI FOLICE)*

Xantopterina (fig. 2.70), izolată din pigmenții aripilor fluturilor, levuri, ficat, vindecă citopenia și anemia macrocitară a maimuței, de unde denumirea de *vitamină M*. Se pare că vitamina M este o formă conjugată a acidului folic și că xantopterina servește ca un precursor al acesteia la maimuță *(P. L. Day și colab., 1938)*. Xantopterina este eficientă și în anemia nutrițională ce apare la șobolanul hrănit cu lapte de capră sau căruia i s-a administrat sulfatiazol, dar nu este activă în anemia pernicioasă umană.

S-a presupus existența unor factori de origine hepatică necesari creșterii și dezvoltării penelor la puii de găină, denumiți *vitamina* B_{10} *și* B_{11}, dar, se pare, că avitaminozele atribuite carenței acestora se datoresc, în realitate, carenței folinice și B_{12} *(Tabelul 2.9)*.

Biopterina: 2-amino-4-hiroxi-6-(1′, 2′-dihidroxipropil)-6-pteridina *(fig. 2.70)* manifestă un efect de „economisire" a acidului folic, cel puțin în creșterea unor protozoare, de exemplu, *Crithidia fasciculata*.

Prin substituirea în acidul pteroic a grupării —COOH cu $-As(OH)_2$ se obține acidul 4 — [(2-amino-4-hidroxi-6-pteridil)-metil]-paraamino-benzoarsonic, cu acțiune cancerostatică.

Antimetaboliți (antivitamine) PAB și folici (antifolice). Este necesară precizarea că se cunosc antagoniști ai acizilor folici și/sau folinici și ai componenților acestora: PAB, acid glutamic *(fig. 2.73)* și că aceștia acționează prin mecanisme diferite și cu consecințe și aplicații terapeutice variate.

La microorganismele care nu necesită acidul folic preformat și care folosesc PAB ca un precursor în biosinteza acestuia, *sulfamidele* (analogi structurali) intră în competiție cu PAB *(D. D. Woods, 1940) (cap. 2.1.14.1)* și afectează astfel producerea acizilor folici/folinici și respectiv a coenzimelor care îi conțin, cu formarea unor pseudosubstrate sau coenzime inactive, a căror conse-

cinţă este inhibarea dezvoltării microorganismelor PAB-dependente. Organismele superioare, inclusiv omul, nu pot sintetiza acidul folic şi necesită aportul său exogen. În asemenea situaţii, sulfamidele nu intră în competiţie cu PAB în biosinteza acidului folic (deoarece acesta nu se sintetizează în organismul respectiv) şi deci sulfamidele nu le afectează, decît în măsura în care alterează flora intestinală şi determină astfel o stare de carenţă folinică, asociată şi cu alte manifestări policarenţiale. Pe acest principiu se bazează dezvoltarea chimioterapiei moderne, cu analogii competitivi ai PAB, cum sînt diferitele tipuri de sulfamide (şi derivaţi ai acestora) larg utilizate în terapia infecţiilor cu stafilococi, streptococi, meningococi, gonococi etc., ca de exemplu, în dizenteriile bacilare, febră tifoidă, holeră, toxiinfecţii alimentare, în infecţiile apa-

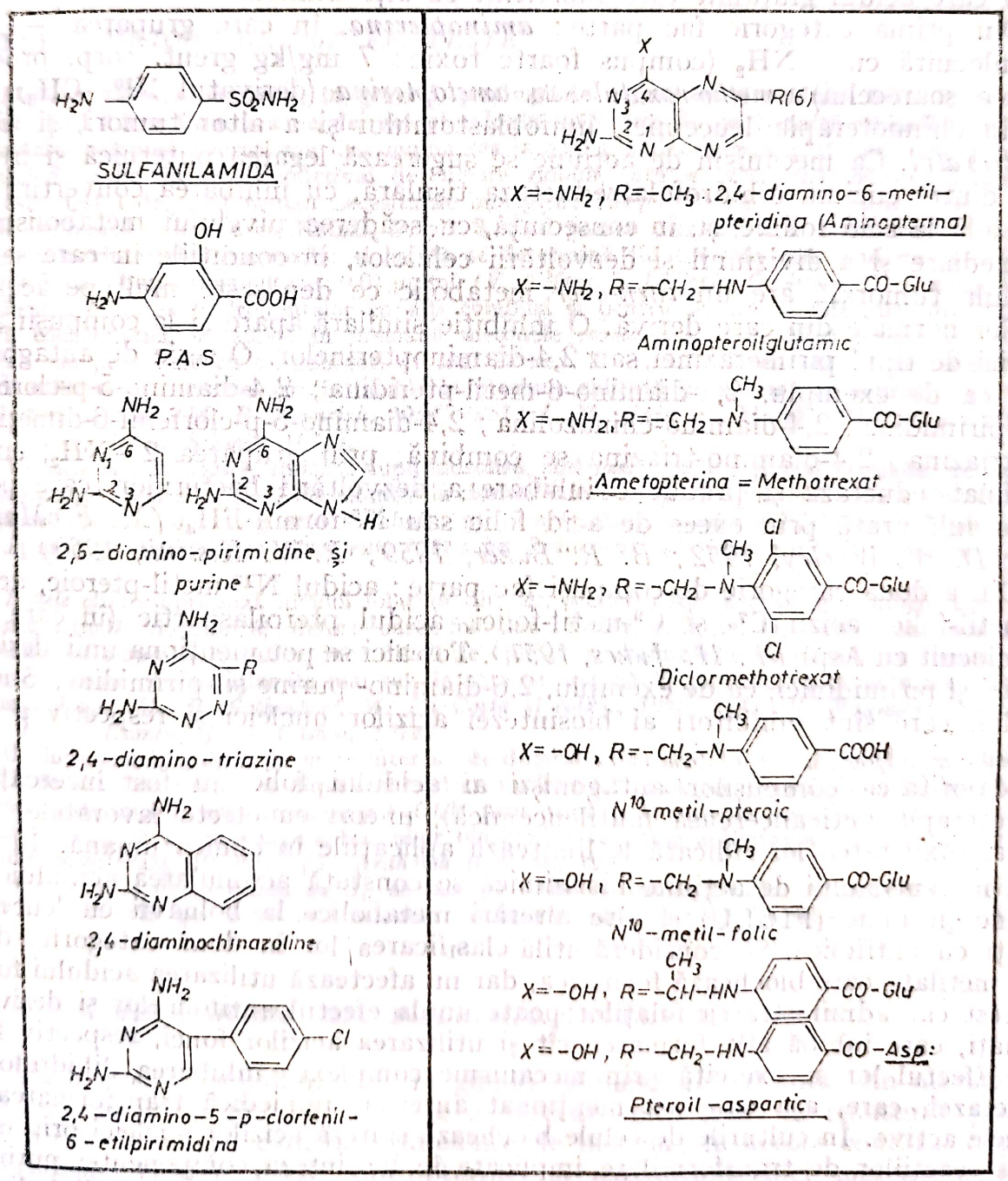


Fig. 2.73. Antivitamine (antimetaboliţi) folici şi folinici

ratului renal-urinar, în meningita meningococică, în pregătirea preoperatorie, în combaterea septicemiilor etc.; sau acidul paraaminosalicilic (PAS) care pare că se substituie PAB-ului în molecula acidului folic, în terapia tuberculozei *(D. D. Woods, 1940; E. A. Bliss, P. H. Long, 1941, 1957; E. E. Snell, H. K. Mitchell, 1942; W. Shive, 1950; G. Domagk, 1957; A. Waker, H. Kolm, M. Ebert, 1958)*.

Atît la organismele care sintetizează, cît şi la cele care sînt tributare aportului exogen de acizi folici, analogii acestora (antifolice) *(fig. 2.73)* pot afecta formarea enzimelor folinice, cu consecinţe asupra proceselor metabolice. Se obişnuieşte clasificarea antagoniştilor acizilor folici/folinici în două grupe: cei cu structură de 2,4-diamino-pirimidine sau 2,4-diamino-triazine şi compuşi 2-amino-4-hidroxi-pirimidinici, compuşi Pte-Glu, alchilaţi în poziţia 9 sau 10 sau în care acidul glutamic este substituit cu alţi aminoacizi.

Din prima categorie fac parte: *aminopterina*, în care gruparea —OH/4 este înlocuită cu $-NH_2$ (compus foarte toxic: 7 mg/kg greut. corp. produce moartea şoarecelui); *methotrexatul* sau *ametopterina* (derivatul $N^{10}-CH_3$), utilizat în chimioterapia leucemiei, limfoblastomului şi a altor tumori, şi *diclormethotrexatul*. Ca mecanism de acţiune se sugerează legarea puternică şi ireversibilă dintre enzima dihidrofolatreductaza tisulară, cu inhibarea convertirii acidului folic la acid folinic, şi, în consecinţă, cu scăderea nivelului metabolismelor intermediare şi a diviziunii şi dezvoltării celulelor, în condiţiile în care se ştie că celula tumorală are un *turn-over* metabolic ce depăşeşte mult pe acela al celulelor normale din care derivă. O inhibiţie similară apare şi la compuşii antimalarici de tipul pirimetazinei sau 2,4-diaminopterinelor. O serie de antagonişti folici, ca de exemplu, 2,4-diamino-6-metil-pteridina; 2,4-diamino-5-p-clorfenil-6-etil-pirimidina; 2,4-diamino-chinazolina; 2,4-diamino-5-p-clorfenil-6-dimetil-dihidrotriazina; 2,4-diamino-triazina se combină, prin gruparea $2-NH_2$, cu dihidrofolat-reductaza şi produc o inhibare a dezvoltării bacteriilor, care poate fi uşor înlăturată prin exces de acid folic sau N^5-formil-FH_4 *(M. F. Malette, 1947; D. W. Wooley, 1952; B. R. Baker, 1959; R. W. Kislink, 1960)*.

Din a doua categorie de compuşi fac parte: acidul N^{10}-metil-pteroic, acidul N^{10}-metil-folic, acizii C^7- şi C^9-metil-folici, acidul pteroilaspartic (în care Glu este înlocuit cu Asp) *(T. H. Jukes, 1951)*. Tot aici se pot menţiona unii derivaţi purinici şi pirimidinici, ca de exemplu, 2,6-diamino- purine şi -pirimidine, 5-nitro uracilul, care sînt inhibitori ai biosintezei acizilor nucleici şi respectiv a proteinelor.

Majoritatea compuşilor antagonişti ai acidului folic au fost încercaţi în chimioterapia anticanceroasă (antileucemică), uneori cu efecte favorabile, dar, adesea, toxicitatea lor ridicată le limitează aplicaţiile în clinica umană. În privinţa mecanismului de acţiune biochimică se constată acumularea acidului formimino-glutamic (FIGLU) şi alte alterări metabolice la bolnavii cu leucemie trataţi cu antifolice. Se consideră utilă clasificarea lor în două categorii: derivaţii metilaţi, care blochează formarea, dar nu afectează utilizarea acidului folic; în acest caz administrarea folaţilor poate anula efectul antifolicelor şi derivaţii aminaţi, care inhibă atît formarea cît şi utilizarea acizilor folici, respectiv folinici. Efectul lor se exercită prin mecanisme complexe: inhibarea dihidrofolatreductazei, care, aşa cum s-a menţionat anterior, împiedică transformarea în formele active. În culturile de celule blochează sinteza acizilor nucleici prin inhibarea reacţiilor de transformilare implicate în biosinteza componentei purinice şi, ca o consecinţă, asemenea celule în cursul mitozei rămîn în stadiul dintre

metafază și anafază. Efecte similare, cu punct de atac ADN, se constată și în celulele canceroase, care sînt caracterizate printr-un grad de dezvoltare și *turn-over* ridicat. *Aminopterina* este indicată în terapia leucemiei, în special la copii, dar administrarea ei îndelungată este limitată din cauza instalării, în timp, a unei inducții a dihidrofolatreductazei, care duce la apariția unor celule leucemice rezistente la medicamentul administrat, precum și prin afectarea ADN din alte celule cu *turn-over* ridicat, cum sînt cele din măduva osoasă hematoformatoare. Dacă o asemenea terapie „de risc" cu antifolice este absolut necesară pentru menținerea vieții pacienților, se recomandă combaterea reacțiilor secundar-adverse, prin administrarea acidului folic, N^5-formil-FH_4 sau FH_4 (mai puțin stabil).

2.1.15.3. *METODE DE DOZARE. TESTE*

Metodele chimice urmăresc, în general, produșii de degradare ai acidului folic. Prin reducere cu Zn în HCl 0,5 se formează un derivat pteridoxin-PAB care dă cu N-naftil-etilendiamina (diazotare-cuplare) compuși coloranți sau descompunerea la acid p-amino-benzoil-glutamic, care în prezența nitritului de sodiu dă un diazoderivat de culoare violetă, care se determină colorimetric (sensibilitatea este destul de mică pentru necesitățile biologice: 100 μγ/ml) *(B.L. Hutching, 1947)*. O altă metodă utilizează oxidarea cu $KMnO_4$ la pH 3, cînd partea pteridinică se transformă în acidul 2-amino-4-hidroxipteridin-6-carboxilic și acesta se determină fluorimetric prin iradiere la 365 nm la pH 4—4,5, cu o bună sensibilitate: 0,01 μg/ml. *(V. Allfrey, L. J. Teply, C. Geffen, C. G. King, 1949)*.

Pentru evitarea interferențelor cu alți compuși și pentru separarea diferiților derivați folici, folinici, coenzimatici, se aplică în prealabil metodele *cromatografice* în diferite variante: pe hîrtie de filtru sau pe colane cu schimbători de ioni Dowex X—1, DEAE-celuloză, Ecteola-celuloză; de o mare utilitate este cromatografia lichidă la presiune ridicată pe sisteme cu suprafețe poroase cu schimbători de ioni *(M. R. Heinrich, 1954, 1961; I. M. Hais, K. Macek, 1963; R. C. Williams, D. R. Baker, J. A. Schmit, 1973)*.

Metodele microbiologice, aplicate după hidroliză, sînt mai specifice și mai sensibile, de exemplu, pe *Lactobacillus casei ATCC—7469* adaptat la cloramfenicol se aplică o metodă care a fost automatizată (sensibilitatea: 0,5 m μg acid folic/ml); pe *Streptococcus faecalis ATCC—8043* (sensibilitatea: 0,3 m μg/ml); pe *Leuconostoc citrovorum-8081*; pe *Pedicoccus cerevisiae* etc. *(I. Chanarin și colab., 1972)*.

Testele clinice apreciază nivelul folaților din ser, scăderea lor fiind primul indiciu care relevă o carență actuală (biochimică); determinarea folaților din ficat ar fi mai ilustrativă, dar este limitată de necesitatea biopsiilor hepatice, încă dificil de aplicat în examinările de rutină. Ca tehnici pentru dozări se folosesc cele menționate mai sus, la care se adaugă în prezent, cu mare succes, metodele radioimunologice *(S. P. Rothenbert, M. Da Costa și colab., 1972, 1974; S. Waxman, C. Schreiber, 1973; B. A. Kamen, J. D. Caston, 1974)*.

Un indicator biochimic de mare interes este determinarea acidului formiminoglutamic sau *testul FIGLU*, pe baza observației că după administrarea a 20 g histidină *per os* se elimină, în mod normal, cantități foarte mici de acid urocanic și *FIGLU* prin urină și că aceștia cresc foarte mult în carența folinică și B_{12}, ca o consecință a leziunilor biochimice ce reduc activitatea enzimei urocanază și formiminotransferaza din ficat *(T. Arakawa și colab., 1963)*.

Diferențierea de avitaminoza B_{12} se face pe baza *testului terapeutic*: administrarea unei doze de 0,1 mg acid folic pe zi, vindecă semnele carenței folinice, dar nu pe cele ale avitaminozei B_{12}.

2.1.15.4. *METABOLISM. ROL BIOCHIMIC. INTERRELAȚII*

Unele specii (șobolan, pui de găină) primesc acidul folic din alimente și flora intestinală și sînt capabile de o oarecare biosinteză în țesuturile proprii, dacă au la dispoziție cantități suficiente de biotină; în aceste condiții, o parte din radioactivitatea PAB, xantopterinei și izoxantopterinei marcate se regăsește în acidul folic.

Scanned with OKEN Scanner

Biosinteza are loc la unele microorganise (inclusiv din flora intestinală) și, după cum s-a menționat, într-o măsură mai mică și în mod condiționat în țesuturile unor animale. Transformarea acidului folic în acizii folinici activi coenzimatic *(fig. 2.74)* are loc și în organismul omului și animalelor și necesită acid ascorbic (în carența vitaminei C scade eliminarea folaților și metaboliților).

Absorbția necesită o deconjugare prealabilă la Pte-Glu; sub această formă absorbția este rapidă, începînd din partea proximală a intestinului subțire și continuă, pe toată lungimea sa, cu implicarea unor procese active, energodependente, pentru cantitățile mici (fiziologice) și prin difuzie pasivă pentru cantitățile mari (terapeutice). Se consideră că acidul folic și FH_2 sînt convertiți, în mucoasa intestinală, sub influența acidfolicreductazei la $CH_3—FH_4$, formă sub care trece în sîngele venei porte și de aici în ficat. Din totalul de aproximativ 70 mg acizi folici/folinici existenți în organismul uman, cam 1/3 se găsesc în ficat (5—15 μg/g), care aprovizionează toate țesuturile, prin circulația sistemică.

Vehicularea se face, în special, sub formă de $CH_3—FH_4$ legat de proteine, în cantitate de 300 ng/ml sînge. În timpul eritropoezei folații sînt încorporați în eritrocite unde persistă (cu mici scăderi ale concentrației) pe tot parcursul vieții acestora; de aceea, nivelul folaților din eritrocite reflectă gradul de aprovizionare ale întregului organism (normal: 160—640 ng/ml eritrocite). Nivelul folaților din sînge scade în carența folică și anemia pernicioasă, dar și în ciroza alcoolică, în anemiile gravidice, cancere (leucemii).

În sînge și țesuturi se petrec o serie de procese de interconversiune și de catabolizare. O primă reacție este convertirea acidului folic la derivați tetrahidrogenați; în eritrocite are loc degradarea acidului folic la un derivat aldehidic al pterinei și la acid PAB-Glu; în ficat, N^5-formil-FH_4 este degradat la produși similari, printr-o reacție care necesită Glu ca acceptor și care este inhibată de acidul ascorbic, dar nu este afectată de antivitamina, aminopterina; tot la nivelul ficatului are loc transformarea parțială a acidului folic la acid N^{10}-formil-folinic. Unele microorganisme, de exemplu, *Alcalinigenes metalcaligenes* descompun, ireversibil, sub efectul unei pteridindesaminaze, acizii folici și alte pterine la hidroxiderivații corespunzători.

Eliminarea se face prin fecale în cantitate de 200—500 μg/zi, cuprinzînd aproximativ 20% din vitamina ingerată și partea excedentară (neabsorbită) produsă de flora intestinală. Excreția urinară este mică: 2—5 μg/zi și crește, în paralel cu dozele orale, după saturarea țesuturilor *(L. D. Wright, H. R. Skeggs, A. D. Welch, 1945; 1957; S. Futterman, M. Silverman și colab., 1957; E. M. Magnus, 1963; N. Grassowicz și colab., 1962, 1972; G. Toennies, P. M. Phillips și colab., 1966, 1969; D. W. Martin Jr. și colab., 1983, 1985)*.

Rol biochimic. Acizii folici, sub formă de acizi tetrahidrofolici (N^5-formil-FH_4) reprezintă coenzimele unor sisteme de activare și transport ale fragmentelor „C_1" *(C. A. Nicholl, A. D. Welch, 1950)* implicate în procese de o deosebită importanță pentru organism (celule): *1.* formarea grupărilor metil, *2.* biosinteza bazelor purinice, *3.* biosinteza nucleotidelor (acid timidilic), *4.* transformarea glicinei în serină, *5.* metilarea homocisteinei la metionină, *6.* metilarea etanolaminei (colamină) la trimetil-colamină (colină), *7.* în furnizarea C amidic al histidinei, *8.* metilarea nicotinamidei la N'-metilnicotinamidă (trigonelina), *9.* în biosinteza proteinelor (în etapa formilării t-ARN-Met), *10.* ca factor antianemic, împreună cu vitamina B_{12} *(a se vedea cap. 2.1.16.5)*.

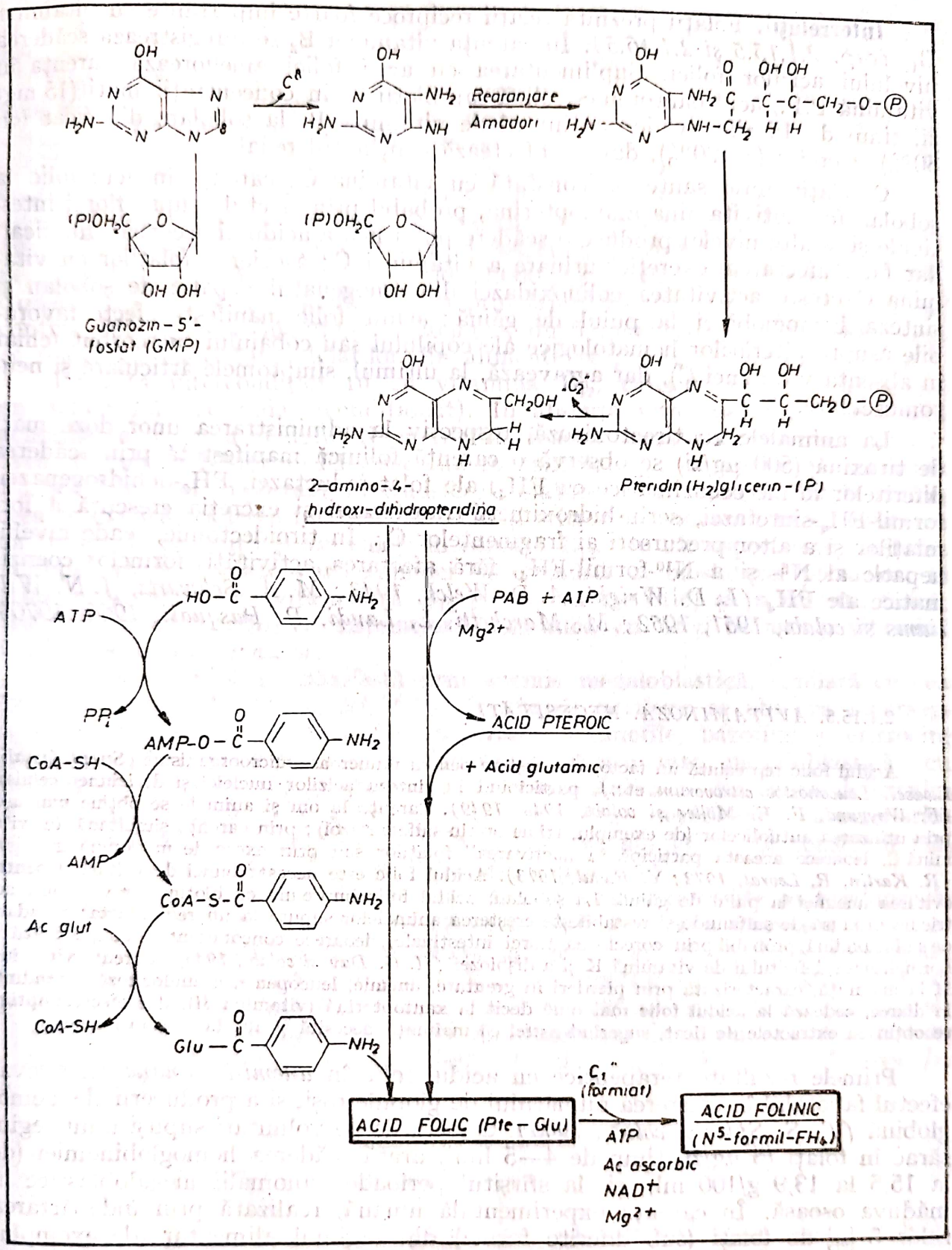


Fig. 2.74. Biosinteza acidului folic şi folinic

Interrelații. Folații prezintă relații reciproce foarte importante cu vitamina B_{12} *(cap. 2.1.15.5 și 2.1.16.5)*. În carența vitaminei B_2 se înregistrează scăderea nivelului acizilor folici. Suplimentarea cu acizi folici ameliorează carența în vitamină P.P., acid pantotenic, colină sau biotină; în concentrații mari (15 mg/zi, timp de 15 zile) scade conținutul de vitamină B_1 la șobolan, din ficat (cu 50%) și creier (cu 20%), dar nu afectează conținutul renal.

Corelații interesante se constată cu vitamina C: carența în acid folic la șobolan (cu antivitamina aminopterina, probabil prin efectul asupra florei intestinale și la alte nivele) produce o scădere puternică a acidului ascorbic din ficat, dar fără afectarea excreției urinare a vitaminei C; asocierea folaților cu vitamina C crește activitatea colinoxidazei din omogenatul hepatic de șobolan și sinteza hemoglobinei la puiul de găină; acidul folic manifestă efecte favorabile asupra alterărilor hematologice ale copilului sau cobaiului cu scorbut (chiar în absența vitaminei C), dar agravează, la ultimul, simptomele articulare și neuromusculare.

La animalele cu tireotoxicoză, respectiv la administrarea unor doze mari de tiroxină (500 μg/zi) se observă o carență folinică manifestată prin scăderea diferitelor forme coenzimatice cu FH_4, ale folat-reductazei, FH_2-dehidrogenazei, formil-FH_4-sintetazei, serin-hidroximetil-transferazei și excreția crescută a formiaților și a altor precursori ai fragmentelor C_1. În tiroidectomie, scade nivelul hepatic al N^5- și a N^{10}-formil-FH_4, fără afectarea activității formelor coenzimatice ale FH_4 *(L. D. Wright, A. D. Welch, 1943; M. A. Schwartz, J. N. Williams și colab., 1951, 1952; M. Marchetti, L. Landi, P. Pasquali, 1966, 1970)*.

2.1.15.5. *AVITAMINOZA. NECESITĂȚI*

Acidul folic reprezintă un factor de creștere pentru numeroase microorganisme *(Strept. faecalis, L.casei. Leuconostoc citrovorum* etc.*)*, participînd în sinteza acizilor nucleici și diviziunea celulară *(F. Weygand, F. E. Möller și colab., 1948, 1949)*. Carența la om și animale se obține mai ușor prin utilizarea antifolicelor (de exemplu, trimetopirin-sulfametazol); prin carența simultană în vitamină C, deoarece aceasta participă în „activarea" folaților sau prin exces de metionină în regim *(R. Karlin, R. Levrat, 1972; Y. Raoul, 1973)*. Acidul folic este necesar bunei dezvoltări și pentru evitarea anemiei la puiul de găină. La șobolan, acidul folic împreună cu biotina previne acromotrichia produsă de sulfamide și restabilește creșterea animalelor supuse la un regim lactat cu adaus de sulfasuxidină, probabil prin corectarea florei intestinale, deoarece concomitent se înregistrează și normalizarea deficitului de vitamină K și a disbiozei *(H. G. Day și colab., 1946)*. Carența vitaminei M la maimuță, caracterizată prin pierderi în greutate, anemie, leucopenie, granulocitoză și tendința la diaree, cedează la acidul folic mai bine decît la xantopterină (vitamina M), dar efectele optime se obțin cu extractele de ficat, sugerînd astfel că maimuța necesită și alți factori antianemici.

Primele rezultate terapeutice cu acidul folic în *anemiile umane* au relevat efectul favorabil în creșterea numărului de globule roșii și a producerii de hemoglobină *(T. S. Spies și colab., 1945)*. Cercetările pe voluntari supuși unui regim sărac în folați (5 μg/zi, timp de 4—5 luni) arată scăderea hemoglobinemiei (de la 15,5 la 13,9 g/100 ml), și, la sfîrșitul perioadei, anomalii megaloblastice în măduva osoasă. În carența experimentală umană, realizată prin îndepărtarea celor 5 μg de folați (sub diferite forme) din regimul alimentar (de exemplu, prin extragere cu apă fierbinte), semnele biochimice și hematologice ale carenței se instalează progresiv: scăderea folaților din ser (sub 3 ng/ml, în primele 3 săptămîni); hipersegmentarea nucleilor neutrofilelor (după 2 luni); creșterea anormală a testului FIGLU (la 3 luni; *cap. 2.1.15.3*); scăderea folaților din

eritrocite (sub 20 ng/ml) şi ficat şi în măduva osoasă cu aspecte caracteristice anemiei megaloblastice (după 4—5 luni), fără modificări megaloblastice, în această perioadă, în mucoasa jejunală, *(V. Herbert, 1962, 1965)*.

Necesităţile umane, apreciate prin adăugarea unor cantităţi cunoscute de acid folic la regimul alimentar fără folaţi, se cifrează la 5 μg/zi. Acidul folic adăugat pare a se comporta diferit de cel existent în alimente, care se găseşte sub formă de complecşi, conjugaţi şi coenzime şi de aceea datele experimentale au doar o valoare orientativă, deoarece nu se cunoaşte precis gradul real de absorbţie a folaţilor naturali şi dependenţa de natura alimentelor şi de condiţiile din tractul intestinal. Considerînd, astfel, şi aportul prin flora intestinală, necesităţile par mult mai mari: 500—1.000 μg/zi *(L. S. P. Davidson, R. H. Girwood, 1947)*, valori argumentate şi prin faptul că regimul alimentar normal conţine 160 μg folaţi înainte, şi, 670 μg/zi, după incubarea cu conjugaze, ceea ce relevă că majoritatea folaţilor din alimente se găsesc sub forme conjugate.

Datorită intercondiţionării cu vitamina B_{12}, carenţa acesteia determină un deficit folic secundar (condiţionat). În absenţa vitaminei B_{12} se constată acumularea în ser a acidului N^5-metil-FH_4 inactiv metabolic, deoarece convertirea acestuia la N^5-formil-FH_4 necesită coenzimele B_{12}; de asemenea, vitamina B_{12} joacă un rol important în transferul folaţilor şi în reţinerea lor în celule, ceea ce explică scăderea folaţilor din ficat şi eritrocite, concomitent cu creşterea lor în ser, la pacienţii şi animalele în carenţă B_{12}. Un alt aspect este creşterea excreţiei amino-imidazol-carboxamidei (intermediar al biosintezei purinelor) în urina persoanelor cu avitaminoză B_{12} (semn caracteristic) şi în carenţa folică, ilustrînd astfel implicarea sistemelor enzimatice cu acizi folinici şi vitamină B_{12} în biosinteza purinelor.

Carenţa folinică se manifestă prin anemie megaloblastică, similară cu cea din avitaminoza B_{12} *(cap. 2.1.16.7)*. În sîngele periferic se observă hipersegmentarea leucocitelor polinucleare (neutrofile, eozinofile, bazofile) şi eritrocite macroovalocite; măduva osoasă hematoformatoare este megaloblastică (cu excepţia cazurilor cînd hemoglobina nu se poate sintetiza, din cauza deficitului de fier sau în unele hemoglobinopatii). Tulburările neurologice, caracteristice avitaminozei B_{12}, care apar în unele cazuri de carenţă folică, se consideră mai mult ca o „coincidenţă" decît ca o relaţie „cauză-efect".

Carenţa în folaţi pare a fi una din cele mai răspîndite avitaminoze la populaţiile din Europa de vest şi America de Nord, fiind mai frecventă la alcoolicii cronici, la pacienţii cu anemii hemolitice sau infestaţi cu viermi intestinali, la unii copii, în sarcină, sprue (tropical şi non-tropical) şi în alte afecţiuni intestinale care reduc absorbţia; în artritele reumatoide şi în boala canceroasă, deoarece ţesuturile maligne sînt mari consumatoare de folaţi *(L. W. Sullivan şi colab., 1964; H. Baker şi colab., 1965; V. Herbert, 1965; D. W. Martin Jr. şi colab., 1983)*.

2.1.15.6. *INDICAŢII TERAPEUTICE*

Preparatele de acid folic au ca indicaţie majoră terapia anemiilor megaloblastice, prin deficit de aport sau absorbţie: anemia pernicioasă fără afectări nervoase, anemiile prin deficit folic, de exemplu, în sarcină, pelagră, sprue; anemiile megaloblastice de origine alimentară (prin rezecţii gastrice sau intestinale extinse, enterite) şi ale sugarului; în formele de cancere însoţite de anemie megaloblastică şi în leucopeniile din cursul chimio- şi radioterapiei cancerului. Se recomandă, de asemenea, în colita ulceroasă, dermatite seboreice, acnee rosacee, enterite posttuberculoase şi postdizen-

Scanned with OKEN Scanner

terice, glosite, insuficiență cardiacă, hepatită epidemică, în terapia cu sulfamide și/sau antibiotice (care afectează flora intestinală) etc.

Acidul folic este contraindicat la bolnavii cu anemii megaloblastice cu leziuni nervoase, care sînt agravate de acidul folic și în cursul terapiei cu antifolice (aminopterină) și unele sulfamide, deoarece prin competiția care apare le anulează efectele terapeutice, dar, în cazul apariției fenomenelor toxice provocate de asemenea antivitamine este indicată administrarea acizilor folici sau folinici *(cap. 2.1.15.2)*.

Folcisteina U, (fiole conținînd în mg: acid folic: 5, clorhidrat de L-cisteină: 250, hexametilentetramină: 250, lidocaină: 21,5, benzoat de sodiu: 6, metabisulfit de potasiu: 7,5, clorură de sodiu: 30, acid sulfosalicilic: 25, carbonat de calciu: 8,75, carbonat de litiu: 0,8 mg) își exercită efectele prin intermediul grupărilor tiolice (—SH) pe care le pune în libertate în organism și care intervin într-un mod decisiv în procese homeostatice esențiale ale metabolismului general (trofic general și hepatic). Este indicată în astenii nervoase, sexuale, în tulburări de climacteriu, migrene, sclerodermie, alopecie, poliartroze, hepatite cronice.

2.1.16. CORINOIDELE. VITAMINELE B_{12}. CIANCOBALAMIDE. FACTOR ANTIPERNICIOS. FACTOR ANTIANEMIC EXTRINSEC. FACTORUL PROTEINELOR LA ANIMALE. [FACTORUL INTRINSEC CASTLE (F.I.C.)]

Istoricul vitaminei B_{12} este legat de cîteva momente importante: descrierea anemiei pernicioase umane *(A. Biermer, 1868)*; efectul favorabil al ficatului crud în anemia experimentală a ciinelui *(G. H. Whipple, 1922)* și la *om*, în cantități de 300—500 g ficat de bou crud/zi, desigur greu acceptat de pacient; obținerea extractelor de ficat cu acțiune antianemică *(M. Gäusslen, 1930)* și evidențierea rolului factorului „intrinsec" în etiopatogenia anemiei pernicioase *(W. B. Castle, 1929)*. La acestea se adaugă: identificarea *factorului antipernicios „extrinsec"* cu factorul de creștere al *Lactobacillus lactis Dörner (M. Shorb, 1947)*; descoperirea *factorului proteinelor animale* (care a condus la administrarea în zootehnie a vitaminei B_{12} și antibioticelor în cantități mici pentru stimularea creșterii și a productivității animalelor domestice); aplicarea în procedeele de extragere a papainei activată cu cianuri, care transformă toate vitaminele B_{12} în *„ciancobalamină"*, artefact cristalizat și stabil *(M. Shorb, 1948)*; izolarea vitaminei pure din mediile de cultură ale *Streptomyces griseus, Streptomyces aureofaciens* și din cele pentru obținerea neomicinei *(E. L. Rickes, K. A. Folkers, 1948; J. V. Pierce, A. C. Page, E. L. Stokstand, T. H. Jukes, 1949; W. G. Jackson și colab., 1951)* și din ficatul de bou *(E. L. Smith; E. L. Rickes; K. Folkers și colab., 1945—1948)*; determinarea structurii parțiale și complete *(K. A. Folkers, 1949; A. Todd, E. L. Smith, I. Sutherland și colab., 1955; Dorothy Crowfoot-Hodgkin, 1958; P. G. Lehnert, D. C. Hodkin, 1961)* și descoperirea coenzimelor corinoide și a rolului lor metabolic *(H. A. Barker, H. Weissbach, R. D. Smyth, 1958; R. M. Bonnet, V. Clark, R. F. Brown, A. Todd și colab., 1959; W. Friederich, G. Gross, K. Bernhauer, P. Zeller și colab., 1960, 1962; E. L. Smith, L. Mervyn, A. W. Johnson, N. Shawn, 1962)*, etc.

2.1.16.1. *STRUCTURĂ. NOMENCLATURĂ. RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE" ANALOGI. ANTIVITAMINE*

Vitamina B_{12} are ca nucleu de bază *corina* (sau *corrina*) similar cu porfirinele, dar cu o legătură —CH= în minus, avînd deci 6 duble legături conjugate care constituie un sistem unic de rezonanță; atomii de C din cele patru cicluri pirolice și respectiv cei din cele trei legături —CH= se numerotează de la 1 la 19 și cei 4 atomi de N cu 21—24; se sare peste cifra 20 pentru a respecta numerotarea porfirinelor *(fig. 2.75)*.

Introducerea pe nucleul corinei a 8 grupări metil, 3 de acid acetic și 4 de acid propionic (în totalitate 7 gupări —COOH, notate cu a—g) și a unui atom de Co duce la *acidul cobirinic*; hexaamida acestui acid (a—e, g) reprezintă *acidul cobiric* sau *factorul* V_{1a}. Prin legarea la —COOH (f) a izopropanolaminei

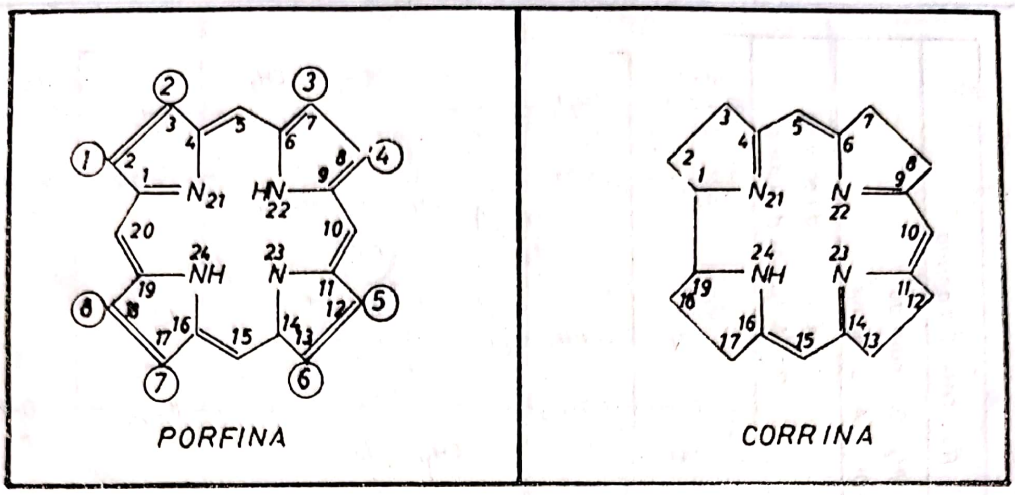


Fig. 2.75. Structura și numerotarea scheletului de porfină și corrină

(IPA) se obține acidul *cobinic*, cu 6 grupări —COOH și respectiv *cobinamida*, în cazul hexaamidei. Atașarea, în continuare a α-D-ribofuranozo-3-(P) conduce la *acidul cobamic*, cu 6 grupări —COOH și respectiv la *cobamida*, cu 6 grupări —$CONH_2$. Prin introducerea în cobamidă a 5,6-dimetil-benzimidazolului (DBI), care se leagă coordinativ cu Co, se obține vitamina B_{12}. Compusul în care Co leagă gruparea cian (—C≡N): α-(5,6-dimetil-benzimidazolil)-cobamid-cianura reprezintă *ciancobalamina* sau *vitamina* B_{12} (farmaceutică), în realitate un artefact *(fig. 2.76 și 2.77)*.

Dacă în locul grupării —CN apare —OH sau $-OH_2^+$ se obțin compuși tautomeri: α-(5,6-dimetilbenzimidazolil)-aquo-cobamida și α-(5,6-dimetilbenzimidazolil)-hidroxi-cobamida, cunoscuți sub denumirea de *vitamina* B_{12a} *și* B_{12b}, respectiv *aquocobalamina* și *hidroxicobalamina*, izolate din mediile de creștere a *Str. aureofaciens, Str. griseus* și cele pentru obținerea neomicinei și care reprezintă forme de depozitare fiziologică (în ficat). S-au izolat și alți compuși înrudiți care au în locul —CN alți liganzi, ca de exemplu, *nitro-cobalamina* sau *vitamina* B_{12c} izolată din mediile de *Str. griseus, clor-cobalamina, tiocianat-cobalamina* etc. Unele din acestea au activitate similară vitaminei B_{12}, altele mai scăzută, în dependență de specie și condițiile experimentale.

Prin substituirea 5,6-dimetilbenzimidazolului cu compuși similari se obțin o serie de analogi structurali, ca de exemplu, α-(5-hidroxi-benzimidazolil)-cobamid-cianura sau *vitamina* $B_{12\ III}$ sau *factorul III*; analogi purinici: α-(2-metil-adenil)-cobamid-cianura sau *factorul A*; cu adenină dă *pseudovitamina* B_{12}; cu 2-mercapto-adenină (izolată din apele reziduale); cu guanină, metil-guanina, guanin-difosfat; cu hipoxantina sau *factorul G* și cu 2-metil-hipoxantina sau *factorul H*. În acești analogi, legătura se face prin N_7 cu restul ribozil, iar prin N_9, coordinativ cu Co. În *factorul B* lipsește complet fragmentul nucleozidic iar derivatul, fără partea IPA și DBI și cu două grupări —CN, reprezintă *factorul* V_{1a} sau acidul dicianocobirinic-a,b,c,d,e,g-hexaamida *(fig. 2.78) (E. A. Kaczka, K. Folkers și colab., 1950, 1951; J. J. Pfiffner, H. W. Dion, D. C. Calkins, 1952; F. D. Brown, J. C. Cain, D. E. Gant, L. T. Parker, E. L. Smith, 1955; K. Bernhauer, F. Wagner, P. Zeller și colab., 1950, 1952)*.

Înlocuirea izopropilaminei (IPA = D-1-metil-2-aminoetanol) cu omologi sau izomeri ai acesteia conduce la analogi structurali cu activitate redusă, de exemplu

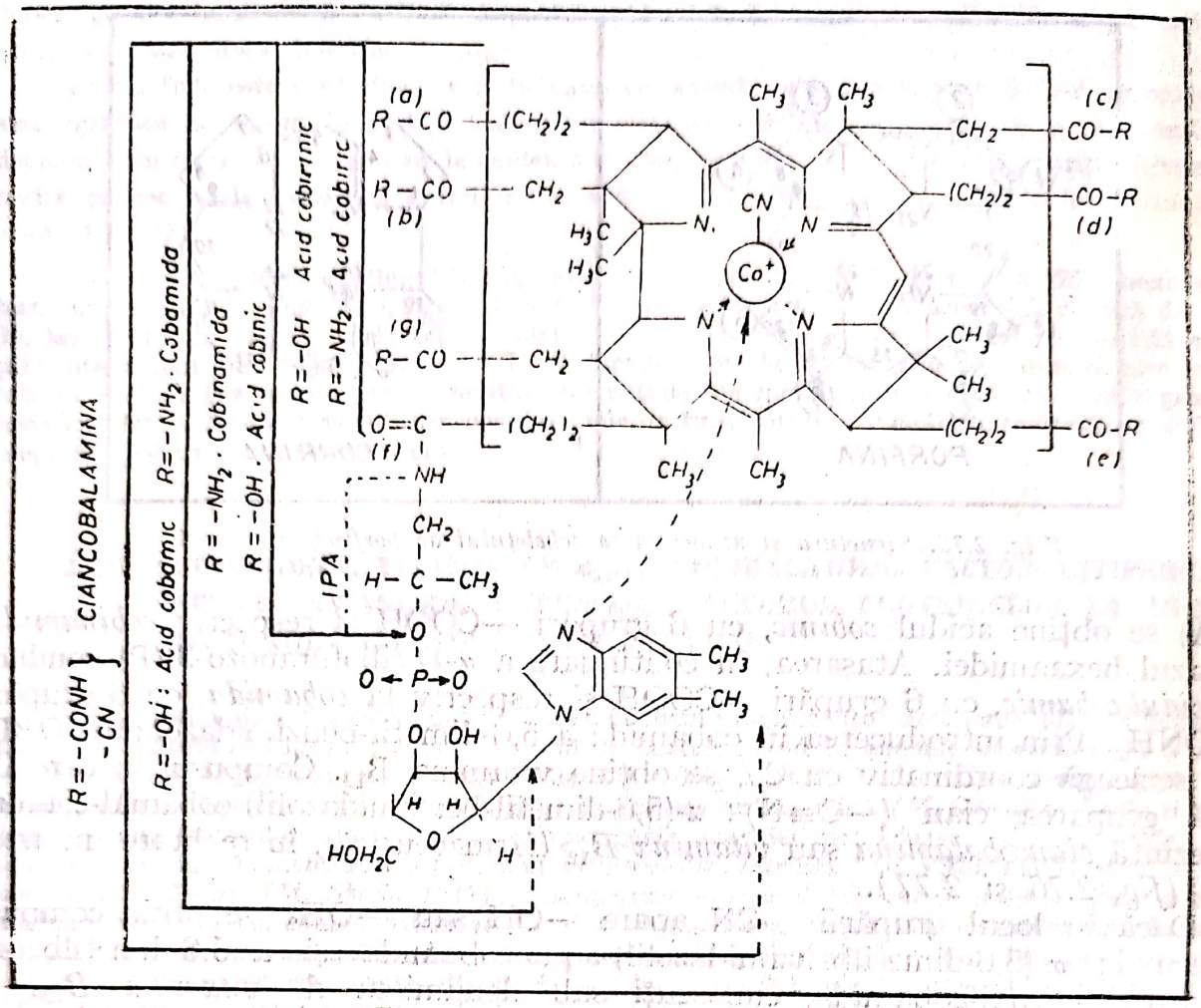


Fig. 2.76. Structura vitaminei B_{12}

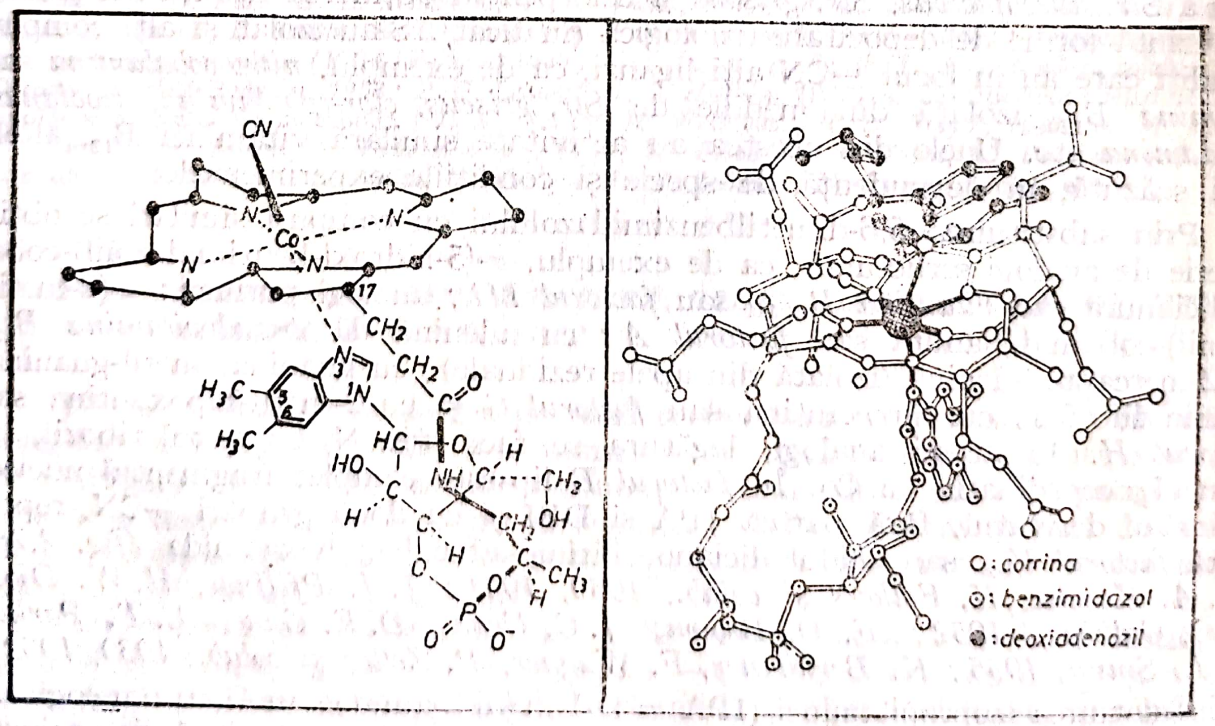


Fig. 2.77. Vitamina B_{12} (ciancobalamina) : diferite formulări

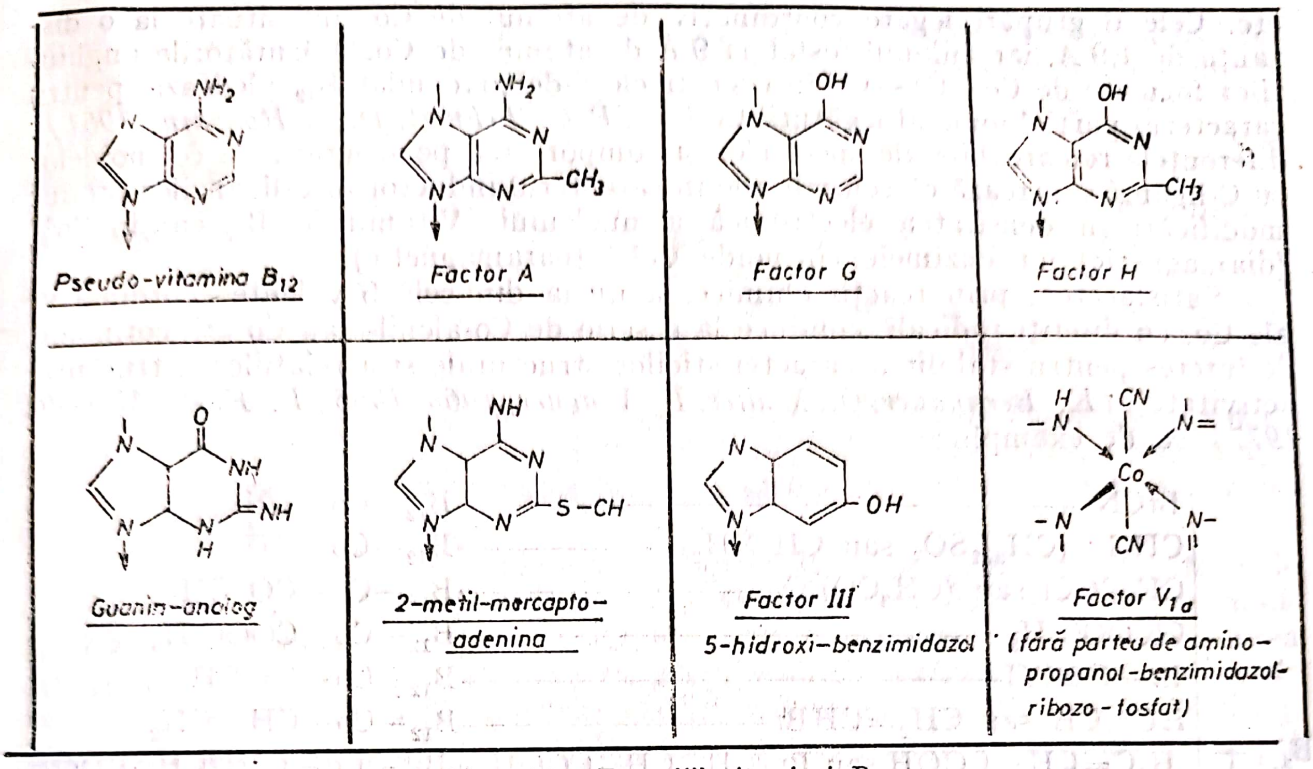


Fig. 2.78. „Factorii" vitaminei B_{12}

cu L-1-metil-2-aminoetanol (60% din activitatea vitaminei) sau la antivitamine, de exemplu, prin înlocuirea cu 2-metil-2-aminopropanol (0,01% din activitate şi cu un indice de inhibiţie de 1500 : 1) *(K. Bernhauer, 1961)*.

Pentru indicarea *valenţei cobaltului* se folosesc următoarele notaţii: ciancob(III) alamina sau *vitamina* B_{12} (culoare roşie); ciancob (II) alamina sau *vitamina* B_{12r} (portocalie-brună), care corespunde stadiului de reducere de un „electron" şi spectrul ESR indică un sistem tetragonal cu spin jos; ciancob(I) alamina sau *vitamina* B_{12s} (cenuşie-verde), instabilă, uşor reoxidată la aer, şi chiar în condiţii anaerobe, cu protonii din soluţie. Această secvenţă de reacţii de reducere are loc în celulă sub acţiunea vitamin B_{12}-reductazei, care necesită NADH şi FAD, şi cu implicarea unor compuşi tiolici; *in vitro*, cob(III)alamina se reduce la cob(II)alamină sub acţiunea cisteinei în soluţie alcalină *(F. Wagner, K. Bernhauer, O. Müller, 1964, 1966; F. Korte, M. Goto, 1977)*.

În **coenzimele corinice** la nivelul Co se leagă deoxiadenozina şi reprezintă: 5'-deoxiadenozil-cobalamina respectiv α-(5,6-dimetilbenzimidazolil)-Co-5'-deoxiadenozil-cobamida. Formarea *in vivo* necesită *enzima de adenozilare*, pe seama ATP şi, probabil, cu participarea flavoproteinelor, ferredoxinei şi/sau a unor tiol-proteine cu greutate moleculară mică *(F. Korte, M. Goto, 1977)*.

Vitamina B_{12} conţine 4% cobalt, adică un atom de Co şi un atom de P/moleculă. Cobaltul joacă un rol esenţial în arhitectura şi funcţiile moleculare. Studiile prin metoda orbitalilor moleculari relevă inelul de corină ca un bun acceptor de electroni *(A. Veillard, B. Pullman,* 1965) şi, totodată, interesul legăturii Co^-, vitamina B_{12} fiind primul compus biologic cunoscut cu metalul legat direct de atomul de C. Nucleul tetrapirolic al corinei oferă patru atomi N coplanari donori pentru legarea Co; poziţia axială 5 de coordinare leagă 5,6-dimetilbenzimidazolul, iar poziţia 6 diferite grupări: —CN, —OH, —NO_2

etc. Cele 6 grupări legate coordinativ de atomul de Co sînt situate la o distanţă de 1,9 Å, iar anionul fosfat la 9 Å de atomul de Co. Măsurătorile unghiurilor formate de Co—$C^{5'}$—$C^{4'}$ în coenzimele 5-deoxiadenilat-B_{12} pledează pentru caracterul parţial ionic al legăturii Co—C *(P. G. Lehnert, D. C. Hodgkin, 1961)*; diferenţele remarcabile ale spectrelor şi comportarea polarografică a corinoidelor cu C-liganzi sugerează că schimbările în caracterul inductor al C-liganzilor produc modificări în densitatea electronică a nucleului. Vitaminele B_{12} conţin Co^{3+} (diamagnetic) iar enzimele corinoide Co^{2+} (paramagnetic).

Satisfacerea, prin reacţii chimice, a uneia din cele 6 valenţe coordinative ale Co, cu diferiţi radicali, conduce la o serie de Co-alchil- sau Co-aril-corinoide, de interes pentru stabilirea caracteristicilor structurale şi a relaţiilor „structură-activitate" *(K. Bernhauer, O. Müller, F. Wagner, 1964, 1966; F. Korte, M. Goto, 1977)* ca de exemplu:

B_{12s} + BrCN → B_{12}—Co—CN

CH_3I; $(CH_3)_2SO_4$ sau CH_2NH_2 → B_{12}—Co—CH_3

CH_3COCl sau $(CH_3CO)_2O$ → B_{12}—Co—$CO \cdot CH_3$

$ClCOOC_2H_5$ → B_{12}—Co—$COOC_2H_5$

Br—C≡CH → B_{12}—Co—C≡CH

HC≡CH sau CH_2=CHBr → B_{12}—Co—CH=CH_2

H_2C=CH—COOH sau Br·CH_2·CH_2·COOH → B_{12}—Co—$CH_2 \cdot CH_2 \cdot COOH$

H_2C—CH_2 (O) sau Cl·CH_2·CH_2OH → B_{12}—Co—$CH_2 \cdot CH_2OH$

H_2C—CH_2 (NH) → B_{12}—Co—$CH_2 \cdot CH_2 \cdot NH_2$

Pentru studiul caracteristicilor cobaltcoenzimelor s-au utilizat modele din chimia bioanorganică, în special combinaţiile complexe cu dimetilglioxima, *cobaloxime (G. N. Schrauzer, 1968)* care au lungimile legăturilor coplanare Co—N şi Co—C similare cu cele din coenzimele naturale. În seria cobamidei, liganzii axiali slabi, alături de apă, ca al cincilea ligand, duc la specii hexacoordinate; donorii tari, ca de exemplu $-C_2H_5$ dau specii pentaccordinate, fără apă ca ligand axial, iar CH_3^- şi $C_2H_5^-$ dau un amestec al celor două forme. Coenzimele sînt amestecuri de specii penta- şi hexacoordinate în echilibru, rapid interconvertibile. Existenţa speciilor pentacoordinate implică efectul *trans*, asociat în special cu carbanionii şi este un efect δ (delta) de rupere a legăturii. În cataliza reacţiilor de reducere şi de transfer a grupării metil, Co din coenzimă trebuie să fie în stare de oxidare joasă. Grupa de transfer este un complex de metil al stării de oxidare joasă a cobaltului, iar grupa acceptor de metil este Co(III). Cobalt-corinoid-enzimele conţin Co(III) care, prin reducere la Co(II) sau Co(I), asigură activitatea biochimică. Acest sistem are o flexibilitate în legătură cu comportamentul redox:

$$Co(III)R^- \rightarrow Co(II)R^{\cdot} \rightarrow Co(I)R^+$$

În coenzimele pentaccordinate, Co(III) se află într-o vecinătate care favorizează Co(II) şi deci transferul electronilor, şi Co(I). Formele coenzimelor şi coba-

loximelor cu Co(I), cu spin împerecheat, stabilizează speciile plan-patratice. Se consideră, deci, că în cobaloximele pentacoordinate, ligandul axial poate fi ușor detașat dînd specii plan-patratice și că în coenzime, legătura celei de a cincea grupe este slăbită prin cuplarea coenzimei la proteină *(după M. Străjescu, Felicia Teodor, 1979)*.

Utilizînd corinoidele lipsite de cobalt, produse de către bacteria fotosintetică *Chromatium D* și de către unele streptomicete s-a reușit sinteza, prin inserare chimică, a unor analogi ai vitaminei B_{12} care au în locul Co alte metale, de exemplu, Cu, Zn, Ru și care sînt de mare interes atît în chimia organometalelor cît și în biochimie *(J. T. Toohey, 1965; V. B. Koppenhagen, J. J. Pfiffner și colab., 1971, 1973)*.

Antivitamine B_{12}. Stabilirea caracterului de antivitamină B_{12} întîmpină mari dificultăți din cauza că același compus, în funcție de specie și/sau concentrație sau alte condiții, se poate comporta ca vitamină, ca antivitamină sau ca un compus indiferent.

Cu aceste rezerve, de ordin metodologic, dintre analogii cu activitate de antivitamină se pot cita cei obținuți prin alterarea sau înlocuirea izopropanolaminei (de exemplu, cu alcan-ol-amine); prin eliminarea Co; prin înlocuirea adenozinei din coenzime cu derivați cu grupări alchil, alchil-substituite, diacetil; eteri ai vitaminei B_{12}; acizi monocarboxilici ai vitaminei și alți produși obținuți prin hidroliză acidă și adaus de H_2O_2; metil-aridele, anilidele și hidrazidele acidului cobamic. O serie de analogi și heterologi ai componentei 5,6-dimetilbenzimidazol pot intra în competiție cu aceasta în biosinteza vitaminei B_{12} sau în sistemele enzimatice corinoide, ca de exemplu, 2,6-dimetilbenzimidazolul; 4,5,6-triclorbenzimidazolul; 1,2-dimetil-4,5-diaminoazobenzolul; 1,2-diclor-4,5-diaminobenzol-diclorhidratul; 1,2-dibrom-4,5-diaminobenzol-diclorhidratul; 1,2-diclor-4-nitro-5-hidroxibenzol; 1-metil-2-clor-5-hidroxibenzol-clorhidrat sau derivații cu 6-mercaptopurină, ribozid-purine, 4-mercaptopteridină, derivați ai nicotinamidei etc. Asemenea compuși, după natura lor chimică, specie și doză pot acționa prin mecanisme diferite și cu efecte variate: inhibarea biosintezei vitaminei B_{12}, cu sau fără inhibarea creșterii microorganismelor; inhibarea pătrunderii vitaminei B_{12} în mucoasa intestinală (cu deficit de absorbție) și respectiv în diferite celule unde își exercită efectul (mamifere, păsări etc.); inhibarea formării sistemelor coenzimatice active; inhibarea celulelor implicate în eritropoeză și respectiv a diviziunii celulelor tumorale, de exemplu, HeLa în culturi de țesuturi etc. *(D. Wooley, 1950, 1953; I. Tamm, K. Folkers, F. L. Horsfall, 1953; H. Baker, O. Frank, S. H. Hunter, H. Sobotka, V. Herbert, 1960; E. L. Smith, 1961; H. A. Harper, V. W. Rodwell, P. A. Mayes, 1979; Matilda Rosetti-Colțoiu, D. Oțeleanu, 1980)*.

2.1.16.2. *PREPARARE. PROPRIETĂȚI. METODE DE DOZARE*

Vitamina B_{12} se obține din diferite surse naturale:

Din ficat (de bovine), prin proteoliză cu papaină activată cu cianură de K, adsorbție pe cărbune și eluare cu alcool etilic de 65 °C la cald; pentru purificare se trece soluția butanolică pe coloane cu silice hidratată sau amidon, urmată de eluare cu alcool de 50° și recristalizare din acetonă (randament: 250—300 mg/tona de ficat). Din mediile (lichidele) de cultură ale microorganismelor utilizate pentru producerea antibioticelor (streptomicină, aureomicină, teramicină etc.) prin adsorbție pe coloane (cărbune, bentonite, amberlit), eluare (piridină, soluții de cianuri, amestec apă-acetonă-HCl etc.) și purificare, de exemplu, pentru culturile de *Streptomyces*: tratare cu KCN, încălzire (eli-

berarea vitaminei B_{12} de proteine), adsorbție pe cărbune, spălare cu fenol 6% (pentru îndepărtarea impurităților), eluare cu acetonă 60%, fracționare cu amestec butanol-sulfat de amoniu, separarea din soluția alcalină cu fenol-benzol, precipitări repetate cu eter și cristalizare din soluție apoasă cu acetonă *(H. Sommer, 1954)*. Metodele care au ca scop principal obținerea vitaminei B_{12} folosesc *Bacillus megatherium*, cultivat pe medii cu melească și săruri minerale; se obține rapid (după 6 ore) un lichid bogat în vitamină B_{12} care după centrifugare și uscare permite obținerea vitaminei cu randament ridicat. Din apele de scurgere ale orașelor, medii prielnice pentru dezvoltarea microorganismelor cobalaminogene, prin cromatografie, eluare etc. Se cunosc și diferite metode de sinteză *(R. M. Bonnett, V. Clark, R. F. Brown, A. Todd și colab., 1959; W. Friederich, G. Gross, K. Bernhauer, P. Zeller, 1960)*, dar acestea prezintă interes numai în cercetare și nu rentează în prepararea industrială.

Proprietăți. Ciancobalamina se prezintă sub formă de cristale sau pulbere cristalină roșie-închisă, fără miros și fără gust, cu P.T. 300—320° (cu descompunere). Substanța anhidră este higroscopică (fixează pînă la 12% apă), este puțin solubilă în apă (1 : 80) și etanol (1 : 150—180), practic insolubilă în eter, cloroform, benzen, acetonă (F.R.IX).

Soluția de ciancobalamină rezistă la 120°C/20 minute la pH = 5,0; în acest scop se propune tamponarea cu fosfat monosodic 0,02 M, care scade sub 5% pierderile vitaminei *(A. Donald și colab., 1963)*. La pH peste 9, vitamina este rapid distrusă. Lumina solară directă inactivează 10% în fiecare 30 minute, iar cea difuză poate duce la pierderi de pînă la 80% în decurs de 6 luni, prin formarea hidroxicobalaminei (mai sensibilă la oxigenul din aer).

Ciancobalamina este *incompatibilă* cu substanțele cu reacție puternic alcalină sau acidă, cu agenții oxidanți sau reducători, sărurile metalelor grele. Distrugerea sa este intensificată (accelerată) de către substanțele oxidante și cele reducătoare: cisteină, tioderivați (acidul tioglicolic), sulfiți, glucoză; acidul ascorbic, la 30°C degradează 50% din vitamina B_{12}. În prezența vitaminei B_1, în concentrație peste 1%, produsele de descompunere ale acesteia favorizează distrugerea ciancobalaminei, chiar cînd se asigură pH-ul optim de 4,0—7,0; în raporturile limită de vitamină $B_1 : B_{12}$ (120 : 1) inactivarea nu are loc, dar se înregistrează o descopunere în cazul asocierii și cu nicotinamida. Un preparat relativ stabil se obține prin adăugare de tiamină (1%), piridoxina (1,5%), pantotenat de calciu (3%) la pH = 5. Pentru stabilizare se recomandă și tiocianatul de potasiu (1 mg/ml), cînd pierderile sînt de numai 4,8%/an; săruri de fier, de exemplu, fero- sau fericianura de potasiu 0,001—0,005%, săruri de cupru, cianura de potasiu, dietilcarbamida. Riboflavina favorizează fotoliza ciancobalaminei, efect potențat de nicotinamidă și scăzut prin adăugarea antioxidanților. Preparatele care conțin ciancobalamină 0,050 mg, acid ascorbic 50 mg, propilenglicol 50 mg și glicerol q.s. la 1 ml, păstrează, după 6 luni la 40°C, 85% din activitatea vitaminei C și 80% din a vitaminei B_{12}. Soluțiile de ciancobalamină pot fi protejate contra contaminării microbiene prin adaus de alcool benzilic (2%) sau azotat fenilmercuric (0,001%). Tabletele cu vitamină B_{12} pierd prin conservare 30—40% din activitate pe an.

Este contraindicată asocierea sau administrarea ciancobalaminei concomitent cu manitolul, fosfat de calciu sau talc (care o absorb); EDTA-sodic (care blochează ionii de Ca^{2+} și de Mg^{2+} din epiteliul peretelui intestinal, care reprezintă puntea de legătură între vitamina B_{12} și factorul intrinsec d'n mucoasa intestinală *(E. Blitz și colab., 1954; a se vedea și cap. 2.1.1.6)*; colchicina, metformin (din terapia diabetului); PAS (reducerea absorbției) *(V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Metoae de identificare și dozare. În U.V. prezintă trei maxime de absorbție, la 278, 361 și 550 nm; în dozarea spectrofotometrică: $E_{1\ cm}^{1\%}$ la 361 nm = 207.

Identificarea se poate face prin încălzirea a 0,5 mg în prezență de 0,02 g hidrogen sulfat de potasiu; după răcire se tratează cu o picătură apă și trei picături tiocianat de potasiu în acetonă: apare o coloratie albastră-verzuie (F.R.IX).

În dozările *chimice*, se determină 5,6-dimetilbenzimidazolul eliberat prin hidroliză acidă, sau cianul eliberat prin fotoliză, considerîndu-se că aceștia se găsesc în organism numai în molecula vitaminei B_{12}.

Metodele cromatografice se aplică, în prealabil, permițînd separarea vitaminei B_{12} de alți produși sau derivați ai săi *(B. M. Babior, A. D. Woodams, J. D. Brodie, 1970, 1973)*.

Metodele *microbiologice* urmăresc creșterea *Lactobacillus lactis Dörner* sau *L. leichmanii* (sensibilitatea: 4 μμg/ml), dar rezultatele sînt falsificate de timidină și alte dezoxiribonucleotide, care asigură creșterea și în absența vitaminei B_{12}. *Bacterium coli 113—3 mutant Davis* poate servi pentru dozarea vitaminei B_{12} (sensibilitatea: 0,004—0,018 μg/g/ml) dar interferează cu metionina, cînd aceasta se găsește în concentrații de 10.000 de ori mai mari decît vitamina B_{12}.

Cu ajutorul algei flagelate *Euglena gracillis* (care își pierde cilii în absența vitaminei B_{12}) se pot doza cantități mici de vitamină B_{12} (0,5 μμg/ml) din lichidele biologice (de exemplu, din sînge), cu avantajul de a nu interfera cu dezoxiribonucleotidele, dar cu o durată lungă (4—5 zile). Unele protozoare, de exemplu, *Ochromonas malhamensis*, servesc de asemenea pentru dozarea vitaminei B_{12} din lichidele biologice (de exemplu, din urină).

Scanned with OKEN Scanner

Aplicarea *testelor biologice* impun precauții speciale pentru diferite animale (pui, șobolan, șoarece, maimuță) cu privire la natura alimentației care pot favoriza carența (soia și porumbul, la puiul de găină; lactoza, la șobolan) și de condițiile de păstrare a animalelor pentru evitarea coprofagiei (fecalele sînt bogate în vitamină B_{12}). Aceste metode sînt, în general, lipsite de specificitate.

Formele *coenzimatice* se dozează enzimatic, cu ajutorul dioldehidrazei izolată din *Aerobacter aerogenes* *(R. H. Abeles; C. Meyers; T. H. Smith; H. A. Lee, 1963, 1966)*.

Un indicator prețios este determinarea excreției urinare a *acidului metilmalonic*, care se elimină în cantități mici la persoanele normale (sub 2 mg/zi) și crește foarte mult la bolnavii cu anemie pernicioasă, din cauza deficitului cobaminenzimelor, care izomerizează metilmalonil-CoA la succinil-CoA. Nivelul său reflectă depozitele de vitamină B_{12} din corp: creșterea excreției indică anemia pernicioasă; nivelele crescute încep să scadă de la începutul tratamentului cu vitamină B_{12} dar valorile normale (scăzute) nu se obțin decît după corectarea anomaliilor hematologice și a nivelului vitaminei B_{12} din ser *(E. V. Cox, A. V. White, 1962)*.

În afară de anemia pernicioasă s-a descris o *metilmalonic acidurie ereditară* la copii, atribuită inițial unei mutații a apoenzimei izoenzimei, cu o activitate foarte scăzută pentru cobamidă, dar, ulterior, s-a dovedit că se datorește unui deficit enzimatic în biosinteza dezoxiadenozil-cobamidei, forma activă enzimatic *(M. J. Mahoney, L. E. Rosenberg, 1970)*. Copiii manifestă cetoacidoză și o excreție masivă de acid metilmalonic (800—1.200 mg/zi) care scade prin administrarea vitaminei B_{12} i.m. (la 220—280 mg/zi) dar nu se normalizează complet (1—2 mg/zi).

Este de accentuat că rezultate de certitudine pentru carența vitaminei B_{12} în clinică se obțin numai prin determinările pe om, ca de exemplu, determinarea vitaminei din sînge (carența: valori sub 0,004 μg/100 ml) și dacă este posibil din ficat (biopsii); vitaminuria (1/10—1/20 din valorile normale, orientează spre carență); eliminarea crescută a acidului metilmalonic; creșterea activității lactatdehidrogenazei serice (de 10—100 ori), provenită din megaloblaști; testul *Schilling* de urmărire a comportării vitaminei B_{12}, marcată cu ^{57}Co, ^{56}CO sau ^{60}Co (în condiții normale se elimină prin urină 8—34% și la pacienții cu anemie biermeriană numai 0—3,5% din cantitatea radioactivității ce corespunde vitaminei marcate); rezultatele cele mai corecte le oferă vindecarea anomaliilor hematologice, în urma administrării dozelor-test de vitamină B_{12}, eventual completate cu indicatorii biochimici și enzimatici.

2.1.16.3. *METABOLISM*

Biogeneza vitaminei B_{12} este, practic, limitată numai la unele microorganisme și, în consecință, datorită dezvoltării florei microbiene rumenul animalelor rumegătoare este foarte bogat în vitamină B_{12} (50 μg/100 conținut uscat), la fel și ficatul. Se consideră că tumorile spontane ale șoarecilor, și unele țesuturi ale șoarecilor sau ale iepurelui sînt capabile de o oarecare sinteză *(R. O. Brady, W. L. Newton, 1963)*.

Partea de corină provine din porfirine sau din precursorii acestora, deoarece glicocolul, acidul δ-aminolevulinic sau porfirinogenul marcați sînt încorporați în molecula vitaminei B_{12}; șase din cei opt metili atașați corinei provin din metionină. Deoarece nu s-a izolat macrociclul fără cobalt se susține că metilarea și încorporarea Co sînt anterioare și că prezența Co participă la închiderea ciclului între pirolii A și D, cu ajutorul unei enzime specifice: *„Co-porfirin-sintetaza"*. Prima etapă a corinogenezei se termină cu formarea acidului cobirinic. Cercetările pe *Propionilbacterium shermanii* sugerează, în continuare, două căi posibile: *a.* formarea mono-, diamidelor etc., la fiecare din acestea legîndu-se izopropanolamina (IPA), și *b.* legarea prealabilă a IPA, urmată de amidări succesive; începînd cu acid-cobin-triamida și în continuare are loc încorporarea nucleotidului 5,6-dimetil-benzimidazol-ribozo-fosfat.

În condiții experimentale, 5—6-dimetil-benzimidazolul poate fi înlocuit cu alți compuși (prin adăugarea acestora la mediile de cultură) ca de exemplu, o-fenilen-diamină, benztriazol, adenină, 2,6-diaminoadenină, 2-metil-tioadenina, metil- și clor-derivați ai imidazolului și purinei, obținîndu-se astfel produși de

Scanned with OKEN Scanner

interes în studiul proprietăţilor structurale şi biochimice ale corinenzimelor *(cap. 2.1.16.1) (J.W.G. Porter, 1957)*.

Absorbţia vitaminei B_{12} din alimente şi produsă de flora intestinală are loc la nivelul intestinului subţire. Gradul de absorbţie este puternic condiţionat de „factorul intrinsec al lui Castle", de „factorul de eliberare", de vîrstă, condiţii patologice etc. *(cap. 2.1.16.6 şi 7)*. Se înregistrează un ciclu enterohepatic (similar sărurilor biliare), prin care aproximativ 40 μg/zi trec în jejun, majoritatea fiind reabsorbită în ileum.

Transportul în sînge. Vitamina B_{12} se găseşte, sub diferite forme, în circulaţie, în concentraţie de 140—750 pg/ml, cu variaţii circadiene de 80 pg. Cantitatea din sînge reprezintă numai 0,1% din existentul din organism iar în eritrocite, par a fi cantităţi neglijabile, deşi se poate lega de stroma eritrocitelor şi de hemoglobină. Cantitatea din ser scade la 1/10 din valoarea normală în anemia pernicioasă şi creşte la dublu în leucemii *(J. B. Weinstein, D. M. Watkin, 1960; R. W. Betcher, L. M. Mejer, M. Schneider, 1962; P. L. Krohn, C. E. Oxnard, J. M. Calmers, 1963)*.

Vitamina B_{12} adăugată sîngelui *in vitro* se leagă de γ-globuline şi mai puţin de β — şi α_1 — globuline.

Vitamina B_{12} din sînge se găseşte sub formă de metil-, hidroxi- şi 5′-dezoxiadenozil-cobalamine, vehiculate de cel puţin două proteine: transcobalamina I (8 μg/100 ml) şi transcobalamina II (20 μg/100 ml). *Transcobalamina I*, cu gr. mol. 120.000 migrează electroforetic cu α-globulinele şi leagă puternic cobalamina; ea transportă majoritatea (aproximativ 80%) vitaminei B_{12}, care în această situaţie are $T^1/_2 = 9$ zile, de aceea se consideră ca forma de „depozitare" în circulaţie. *Transcobalamina II*, o proteină dimer (alcătuită dintr-o subunitate cu gr. mol. 38.000 şi alta de 25.000), cu migrare α-electroforetică, leagă mai slab vitamina B_{12} într-un complex implicat în transportul plasmatic (cu $T^1/_2 = 12$ ore), în facilitarea pătrunderii vitaminei B_{12} în reticulocitele umane (unde se leagă de o glicoproteină), precum şi în tumorile ascitice Ehrlich. În deficitul transcobalaminei II se constată şi scăderea nivelului imunoglobulinelor (Ig); se consideră că 1—10% din vitamina B_{12} vehiculată de transcobalamina II este ataşată de aceasta imediat după absorbţia din intestin şi că ea este uşor eliberată pentru a fi excretată prin urină. Hidroxi- şi 5-deoxiadenosil-cobalamina se leagă mai puternic decît cian-cobalamina de proteinele plasmatice şi/sau tisulare şi în consecinţă persistă mai mult în organism.

Corpul omului adult conţine aproximativ 2,5 mg vitamină B_{12} din care 1,5 mg în ficat şi restul în alte ţesuturi, legată de o varietate de proteine receptoare; cantităţile din circulaţie sînt minime (0,1% din total). Eventualul exces se depozitează în ficat sub formele mai persistente: 5′-deoxiadenosil-cobalamină (70%), hidroxicobalamină (27%) şi metilcobalamină (3%) *(A. Miller, J. F. Sullivan, 1958, 1959; K. Lindstrand, 1963; R. Grässbeck, 1969; R. E. Benson şi colab., 1965—1972; J. W. Harris, R. W. Kellermayer, 1970; J. C. White şi colab., 1973)*.

Excreţie. După injectarea la şobolan a 4,24 μg $^{60}Co—B_{12}$ se înregistrează, după 24 h, următoarea distribuţie a radioactivităţii: urină (50%), fecale (6%), restul în ficat, rinichi, splină, inimă. După administrarea *per os* se constată repartizarea radioactivităţii în fecale (81%), urină (1%), restul în diferite ţesuturi, ceea ce sugerează o fixare, utilizare şi eliminare diferită, în raport cu calea de administrare. Din 100 μg vitamină B_{12}, administrată parenteral la om, 50—75% se elimină netransformată. Prin urină se elimină numai formele libere,

Scanned with OKEN Scanner

deoarece formele legate de proteine nu pot fi filtrate prin glomeruli și se înregistrează un „prag de eliminare renală"; la concentrații sub 0,1 μg/100 ml ser nu are loc excreția urinară *(D. M. Watkin, 1961)*. O parte din vitamina B_{12} absorbită și formată prin floră ajunge prin secreția gastrică, pancreatică și intestinală în intestin și rămîne neabsorbită și se elimină, împreună cu cea produsă în colon prin sinteză bacteriană, prin fecale (3—6 μg/zi).

La om se constată o corelație strînsă între conținutul vitaminei B_{12} din organism și nivelul de eliminare, cu diferențe remarcabile între persoanele martor (M) și cele cu anemie biermeriană (B): în ser: 32 μg/100 ml (în general peste 10 μg/100 ml) la M și 4 μg/100 ml la B; în ficat: 800 μg la M și 20—50 μg la B; în urină: 110—270 la M și 20—50 μg/zi la B. Este de menționat că datele recente arată valori mult mai mici: o eliminare prin fecale de 3—6 μg/zi și prin urină de 0—2,25 μg/zi), explicabile prin metodologiile de determinare diferite *(H. A. Harper și colab., 1979)*.

2.1.16.4. *ROL BIOCHIMIC*

Cercetările pe microorganisme, animale și om relevă importanța vitaminei B_{12} sub formă de cobalaminenzime (enzime corinice) pentru dezvoltarea și maturizarea nucleilor tuturor celulelelor, în eritropoeză, în funcțiile sistemului nervos etc., participînd în reacțiile metabolice ale glucidelor, lipidelor și proteinelor.

În *transmetilări*, împreună cu acizii folici, prin reacția schematică: $N^5—CH_3—FH_4 + Enz\text{-}B_{12}—Co^+ \rightarrow Enz\text{-}B_{12}—Co—CH_3 + FH_4$, ca de exemplu în metilarea homocisteinei la metionină. La unele specii (pui de găină, gîscă, șobolan) vitamina B_{12} poate înlocui parțial colina și să manifeste efecte lipotrope și asupra creșterii, în cazul în care regimul asigură cantități suficiente de homocisteină *(H. Weissbach, B. Redfield, H. Dickerman, N. Brot și colab., 1963—1966; M. A. Foster, A. W. Dilworth; D. D. Woods, 1964; S. H. Kermar și colab., 1964)*. Sistemul S-adenosil-metionină oferă grupări $—CH_3$ care servesc pentru metilarea unor acceptori, cu formarea adrenalinei, colinei, creatinei, precum și în biosinteza ARN, ADN etc.

În interconversiunea și utilizarea aminoacizilor, în biosinteza acizilor nucleici și proteinelor. Vitamina B_{12} asigură convertirea ribonucleotidelor la dezoxiribonucleotide (primele se găsesc în ARN, ultimele în ADN). La șobolanul carențat în vitamină B_{12} scade nivelul general al acizilor nucleici și raportul ADN/ARN din ficat *(A. J. Rose, B. S. Schweigert, 1952)*; administrarea vitaminei B_{12} (și a acidului folic) normalizează raportul ADN/ARN și timină/uracil atît în ficatul animalelor carențate cît și în măduva hematoformatoare a bolnavilor cu anemie pernicioasă. În exces de aminoacizi, vitamina B_{12} crește, la om, nivelul acidului uric, sugerîndu-se două mecanisme posibile: stimularea biosintezei purinelor generatoare de acid uric și/sau creșterea catabolizării excesului de aminoacizi. În acest context se relevă și creșterea azotului neproteic (uremie) și a aminoaciduriei la pacienții cu anemie biermeriană și efectul favorabil al vitaminei B_{12} in interconversiunea și respectiv biosinteza Gli, Leu, Tir și Asp (experiențe pe păsări).

Vitamina B_{12} participă în biosinteza porfirinelor și respectiv a hemoglobinei; în anemia pernicioasă, datorită nivelului scăzut al vitaminei B_{12} și folaților, biosinteza protoforfirinei este diminuată și crește fierul seric liber, dovadă a scăderii capacității de sinteză a hemoglobinei.

Scanned with OKEN Scanner

În metabolismul lipidelor: bolnavii cu anemie pernicioasă au un nivel scăzut al fosfolipidelor din sînge iar șobolanul carențat manifestă o scădere a biosintezei lipidelor și fosfolipidelor din schelet și alte țesuturi. Administrarea vitaminei B_{12} crește conținutul lipidelor corporale, chiar în condițiile unui regim de proteine vegetale, deficitar în aminoacizi esențiali.

În transportul sulfului, prin intermediul grupării —SCN; animalele carențate în vitamina B_{12} elimină cantități mai mari de sulfocianuri prin urină (deficit de utilizare); țesuturile conțin o enzimă, *rodanaza,* implicată, împreună cu vitamina B_{12}, în metabolismul grupărilor —CN și —SCN.

În metabolismul glucidelor: la animalele carențate în vitamina B_{12} se constată scăderea gluconeogenezei (din Ser, Ala) și respectiv a încorporării acestora și a glucozei în glicogen; vitamina B_{12} crește utilizarea fructozei, glicerinei și a glicogenului hepatic. Pe de altă parte, administrarea lactozei *per os* și a glucozei *i.v.* crește necesitățile în vitamină B_{12}. În explicarea participării vitaminei B_{12} în metabolismul glucidic se sugerează mecanisme diferite: creșterea nivelului glutationului, coenzimă a gliceraldehid-3-P-dehidrogenazei (la animalele carențate în vitamină B_{12} nivelul compușilor cu sulf, inclusiv a glutationului, este scăzut); efectul direct asupra aminoacizilor glucoformatori și respectiv în utilizarea acidului piruvic și lactic (aceștia sînt crescuți cu 50—100% în carența vitaminei B_{12}).

Se cunosc o serie de reacții enzimatice care necesită adenozilcorinele *(tabelul 2.8)* și care implică: scindarea legăturilor C—C și rearanjarea scheletului de atomi de C; eliminări de H_2O sau NH_3; migrarea grupării amino sau cele care includ metil-corinoidele ca intermediari, de exemplu, transformarea homocisteinei în metionină, sinteza metanului etc. *(F. Korte, M. Goto, 1977).*

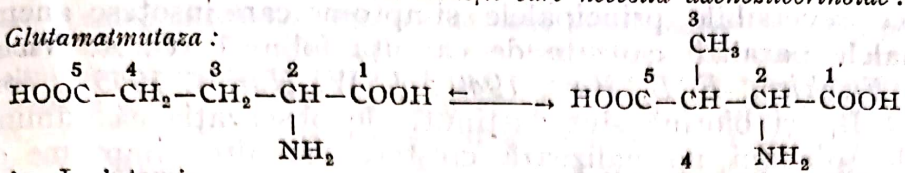
2.1.16.5. *INTERRELAȚII VITAMINICE*

Relația strînsă cu acizii folici a condus la concepția necesității vitaminei B_{12} pentru „ciclul folaților", care se referă la faptul că în lipsa cobalaminei ca acceptor ((carența vitaminei B_{12}) folații sînt „sechestrați" sub formă de N^5-metil-FH_4 (și sînt astfel deturnați de la rolul lor biochimic, de transportori ai grupărilor „C_1" *(E. Ertel, N. Brot, R. T. Taylor, H. Weissbach, 1968; Y. Raoul, 1973; A. Harper și colab., 1979).* În sprijinul interelațiilor (reciproce) a acestor vitamine vin și alte argumente; în carența de acid folic se instalează și o carență B_{12} *(J. B. Alperin, 1964)* și, invers, vitamina B_{12} pare să controleze acțiunea acizilor folinici în transportul grupărilor „C_1"; scăderea acumulării vitaminei B_{12} în ficat și rinichi în carența folinică; scăderea necesităților de acid folic la *Tetrahymena piriformis* în prezența vitaminei B_{12} și, respectiv, creșterea cantităților tisulare a derivaților folinici la animalele tratate cu vitamina B_{12} *(V. C. Devey, G. W. Kidder, 1953; M. Marchetti, P. Pasquale, L. Landi, 1965);* încorporarea mult mai redusă a ^{14}C-metanolului la animalele carențate simultan în vitamină B_{12} și acid folic, față de lipsa numai a vitaminei B_{12}; efectul aditiv al celor două vitamine în creșterea păsărilor, porcilor, șobolanului etc. *(A. E. Schaefer, W. D. Salmon, D. R. Stremgth, D. H. Copeland, 1950; G. E. Cartwright, 1952; W. G. Verly, W. J. Cathey, 1955);* administrarea vitaminei B_{12} în carența folinică produce o remisie hematologică, chiar în condițiile în care concentrația acizilor folici rămîne scăzută în țesuturi, dar nu are

Reacții enzimatice care implică adenozilcorinoidele
(după F. Korte, M. Goto, 1977)

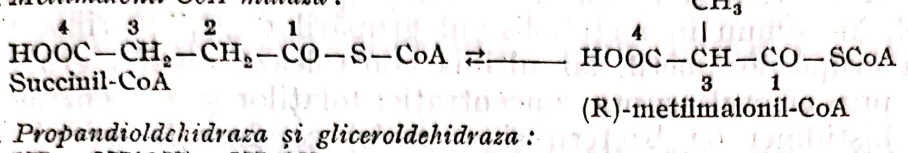
A. *Reacții care necesită adenozilcorinoide :*

1. *Glutamatmutaza :*



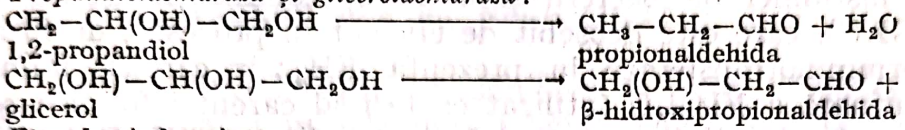
Ac. L-glutamic — L-threo-β-metilaspartat

2. *Metilmalonil-CoA-mutaza :*



Succinil-CoA — (R)-metilmalonil-CoA

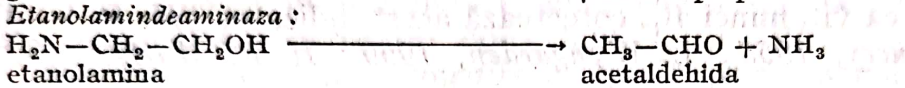
3. *Propandioldehidraza și gliceroldehidraza :*



1,2-propandiol — propionaldehida

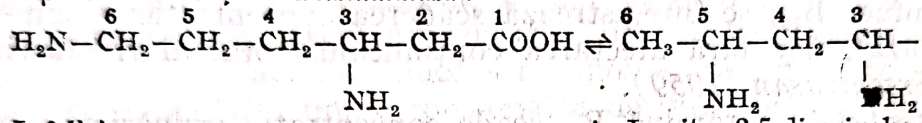
glicerol — β-hidroxipropionaldehida

4. *Etanolamindeaminaza :*

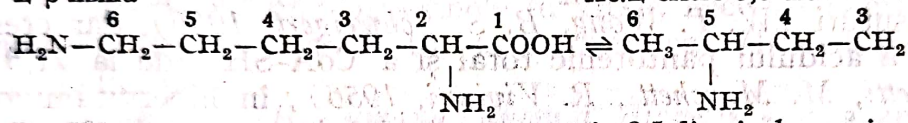


etanolamina — acetaldehida

5. *L-β-lizinmutaza și D-α-lizinmutaza :*

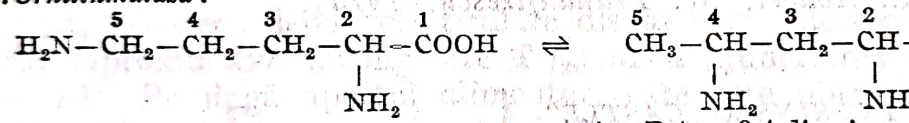


L-β-lizina — Ac. L-eritro-3,5-diaminohexanoic



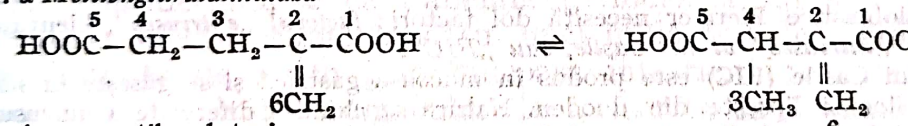
D-α-lizina — Ac. 2,5-diaminohexanoic

6. *Ornitinmutaza :*



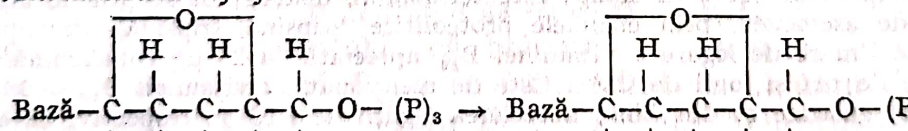
D-ornitina — Ac. D-treo-2,4-diaminopentanoic

7. *α-Metilengluratatmutaza*



Ac. α-metilenglutaric — Ac. metilitaconic

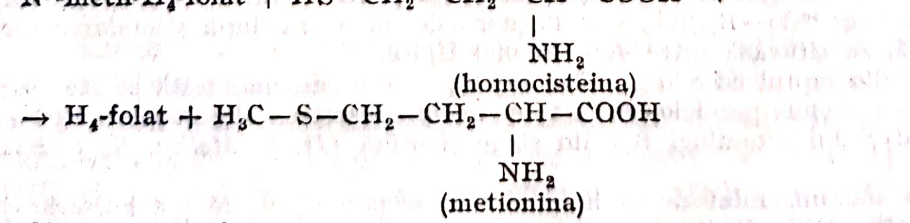
8. *Ribonucleozid-trifosfatreductaza*



Ribonucleozidtrifosfat — Deoxiribonucleozidtrifosfat

B. *Reacții care implică metilcorinoidele ca intermediari :*

1. *Sinteza metioninei :*



2. *Sinteza metanului*

N^5-metil-H_4-folat → H_4-folat + CH_4

3. *Sinteza acetatului*

N^5-metil-H_4-folat + CO_2 → H_4-folat + CH_3COOH

capacitatea de a face reversibile principalele simptome care însoțesc anemia macrocitară și eventualele paralizii cauzate de carența folinică *(C. A. Nichol, L. S. Dietrich, C. A. Elvehjem, E. B. Hart, 1949; J. W. Harris, 1955)*; corelațiile dintre vitamina B_{12} și biotină sînt susținute de observația că administrarea vitaminei B_{12} la șobolani normalizează creșterea și alte simptome din carența biotinei; la rîndul ei, biotina are efecte stimulatoare asupra metilărilor cobamindependente *in vivo* și *in vitro*. Se consideră, astfel, că biotina și vitamina B_{12} participă în comun în metabolismul grupărilor „C_1"; prima este esențială în generarea grupărilor metil, iar ultima controlează nivelul grupelor „C_1" atît direct, cît și prin efectul asupra concentrației folaților și a coenzimelor acestora. Degradarea histidinei (la bacterii și animale) conduce la acidul formimino-glutamic (FIGLU), care este deosebit de eficient în procesele de formilare catalizate de formininotransferaze în prezența FH_4; în carența folinică crește mult excreția urinară a FIGLU (utilizat ca test al carenței folinice *cap. 2.1.15.3)*; administrarea vitaminei B_{12} corectează acest indicator *(H. R. V. Arnstein, 1951; T. D. Lucey, 1955; L. Wyngarden, 1959; H. R. Martson, S. M. Allen, 1970)*.

În carența vitaminei B_{12}, se înregistrează scăderea concentrației enzimelor cu FAD (xantinoxidază), dar fără afectarea conținutului total al riboflavinei *(W. V. Lavate, A. Sreenivasan, 1959)*.

La șobolanul carențat în vitamină B_{12} scade concentrația grupărilor —SH totale din sînge și țesuturi *(W. T. Wong, B. S. Schweigert, 1956)*, dar crește concentrația hepatică a acidului pantotenic total și a CoA-SH (de la 71,5 la 173 U/g: *P. Sanguinetti, M. Marchetti, R. Viviani, 1956)*; în hipervitaminoza B_{12} situația este inversă, scăzînd concentrația acidului pantotenic din ficat *(X. Pierron, 1961; L. Ababei, M. Trandafirescu, 1974)*.

2.1.16.6. *FACTORUL INTRINSEC „CASTLE"*

Terapia anemiei megaloblastice Biermer necesită doi factori: *factorul „extrinsec"*, identificat cu vitamina B_{12}, și *factorul „intrinsec" al lui Castle, sau „FIC"*.

Factorul intrinsec al lui Castle (FIC) este produs în mucoasa gastrică și se găsește în sucul gastric, fundus, puțin în pilor și lipsește din duoden. Natura sa chimică diferă de a mucusului secretat de celulele epiteliului de suprafață a stomacului. Este o mucoproteină cu gr. mol. 53.000—60.000, bogată în glucide reducătoare și acid sialic; este termolabil, distrugîndu-se prin încălzire la 70—80°C/30 minute și, de asemenea, prin enzimele proteolitice (pepsină, tripsină). Principala caracteristică este capacitatea mare de legare a vitaminei B_{12} apreciată la 25 μg cobalamină/mg FIC., cu variații dependente de pH și ionii de Ca^{2+}. Este de menționat că vitamina B_{12} se leagă și de alte proteine: salivare, gastrice și din bilă; aprecierea legării de FIC și, respectiv, de alte proteine din tractul digestiv se face prin metode imunologice *(E. S. Holdsworth, 1951; G.B.J. Glass, 1963; W. J. Irvine, 1966; R. Grässbeck, H. Aro, 1971)*.

Testarea FIC se poate face prin determinarea consumului de vitamină B_{12} de către feliile de ficat; adăugarea sucului gastric de la persoanele sau animalele carențate inhibă, în timp ce sucul gastric normal stimulează consumul cobalaminei. O altă metodă urmărește legarea ^{58}Co-vitaminei B_{12} de sucul gastric căruia i s-a adăugat ser ce conține anticorpi pentru FIC. *Unitatea* FIC corespunde capacității de legare a 1 μg $^{58}Co-B_{12}$/ml; valorile normale, la o oră după stimularea secreției gastrice cu pentagastrină, se situează între 400—25.000 U/oră.

Importanța FIC rezultă din faptul că 500 μg vitamină B_{12} *per os* nu manifestă efecte asupra vitaminemiei B_{12} la pacienții cu anemie pernicioasă, în timp ce administrarea simultană a FIC produce o creștere marcată a nivelului vitaminei B_{12} din sînge și urină *(D. L. Mollin, S. J. Baker, 1955)*.

Dintre ipotezele asupra mecanismului de acțiune al FIC se pot reține, în special, cele care susțin formarea unei combinații „FIC—B_{12}", argumentate de observația că extractele de mucoasă gastrică favorizează fixarea $^{60}Co-B_{12}$ în peretele intestinal și că factorii care scad capacitatea de

legare îi reduc activitatea. FIC posedă două locuri receptoare: unul pentru legarea vitaminei B_{12} (factorul extrinsec) eliberată din alimente în timpul digestiei stomacale, formînd complexul „FIC—B_{12}" și altul pentru microvilii intestinali (ileum). Acest ultim receptor necesită specific un pH neutru și prezența ionilor de Ca^{2+} și se saturează ușor, limitînd astfel absorbția vitaminei B_{12}. Complexul „FIC—B_{12}", rezistent la pepsină și tripsină, reprezintă forma de „protecție" față de microorganismele consumatoare de vitamină B_{12} din flora intestinală și, totodată, forma de absorbție în ileum. În continuare, are loc desfacerea vitaminei B_{12} din acest complex sub acțiunea unei „enzime de eliberare" (E.E.) care se găsește în intestin (dar și în ficat, rinichi, tiroidă) și care posedă o remarcabilă speciospecificitate (E.E. uman nu desface complexul de la șobolan și invers). Atît FIC cît și E.E. sînt implicați în absorbția normală și, respectiv, în producerea anemiei biermeriene *(cap. 2.1.16.7)*

2.1.16.7. *AVITAMINOZA B_{12}. NECESITĂȚI*

Carența vitaminei B_{12} se manifestă la puiul de găină prin perosis și leziuni renale; la șobolan prin tulburări hematologice, iar la porc prin încetarea creșterii, anemie și moarte (în două luni).

Necesitățile omului, acoperite obișnuit prin aportul alimentar și sinteza florei intestinale, se cifrează la 1—2,5 μg/zi, dar ele pot crește la 5—10 μg/zi, în dependență de natura alimentației, de stările fiziologice speciale (graviditate) sau patologice: atrofia mucoasei fundice, rezecția stomacului, infestarea cu *Botriocephalus latus* (mare consumator de vitamină B_{12}) și/sau alți viermi intestinali, hipertiroidism; persoanele în vîrstă necesită cantități mai mari de vitamină B_{12} deoarece la aceștia atît formarea FIC cît și procesele de absorbție sînt deficitare.

Avitaminoza B_{12} umană, anemia Biermer sau *anemia pernicioasă* trebuie privită prin prisma complexității sale. Instalarea deplină necesită un timp îndelungat, deoarece depozitele tisulare dispar încet, de exemplu vitamina B_{12} din ficat (aproximativ 1,5 mg) are $T^1/_2$, adică „jumătatea de viață biologică", de 400 zile. Pe lîngă aportul alimentar, care este normal suficient (cu excepția persoanelor strict vegetariene), și din flora intestinală, un rol decisiv revine FIC, considerîndu-se că „anemia pernicioasă nu s-ar declanșa dacă bolnavul ar putea efectua zilnic trasferul unei milionimi de gram (1 μg) de vitamină B_{12} pe distanța de 1 mm prin mucoasa intestinală; el nu poate face aceasta din cauza incapacității stomacului de a secreta în lumenul său această substanță esențială, factorul intrinsec" *(W. B. Castle, 1953)*; pe lîngă FIC apare de interes și factorul sau *„enzima de eliberare"* (E.E.) din intestin. În sprijinul acestei concepții vine observația că bolnavii cu anemie pernicioasă elimină cantități crescute de vitamină B_{12} prin fecale, indiciu al unui deficit în absorbția intestinală, prin lipsa FIC și/sau E.E., precum și faptul că la acești bolnavi, 10—15 μg vitamină B_{12} *inj. i.m.* are un efect echivalent cu 3.000 μg vitamină B_{12} *per os*, diferență datorită afectării absorbției intestinale. Deficitul de vitamină B_{12} din sprue nu se ameliorează prin administrarea vitaminei B_{12} *per os*, deoarece în acest caz apare afectarea generală a mecanismelor de absorbție intestinală.

Anemia biermeriană (umană) necesită o interpretare „sub aspect cantitativ, cu nuanțele, gradele și evoluția sa" *(F. Besançon, R. Wolff)*. În acest sens, se menționează, că la majoritatea adulților cu anemie pernicioasă, se poate depista existența a cel puțin două sisteme antigen — anticorpi în stomac: unul contra FIC și un sistem de fixare al complementului în care anticorpii sînt îndreptați față de celulele parietale ale stomacului. Aceste observații, coroborate cu mucoasa gastrică atrofică, sugerează caracterul de boală autoimună.

La copii se cunoaşte *anemia pernicioasă congenitală* prin deficit de vitamină B_{12}, care apare în perioada postnatală (de obicei înaintea vîrstei de 2—3 ani) şi se datoreşte, specific, lipsei FIC, neînsoţită de alterările mucoasei gastrice şi de lipsa aciditătii gastrice. O altă formă, *anemia pernicioasă juvenilă*, apare la sfîrşitul copilăriei şi se caracterizează prin lipsa secreţiei FIC, asociată cu aclorhidrie şi gastrită atrofică. Serul acestor copii conţine anticorpi contra FIC şi/sau contra celulelor parietale, vehiculaţi de fracţiunea γ-globulinică şi care au un efect de inhibare a absorbţiei vitaminei B_{12} FIC-mediată *(D. W. Martin Jr. şi colab., 1985)*.

Semnul cel mai caracteristic şi ilustrativ pentru anemia pernicioasă este pierderea capacităţii de diviziune normală, situaţie mai evidentă pentru celulele cu un ritm rapid de refacere, ca cele din mucoasa intestinală, şi, mai ales, din măduva osoasă hematoformatoare. Aspectul megaloblastic-macrocitar caracteristic se relevă prin granulocite gigante (macrocite), care deşi păstrează capacitatea de transport a O_2 nu pot îndeplini corespunzător această funcţie primordială, din cauza duratei de viaţă mai scurtă (1/2—1/3 faţă de hematiile normale), atribuită fragilităţii membranei externe, şi din cauza unui număr redus al eritrocitelor tinere; la acestea se adaugă şi trombocitopenia. Extinderea acestor anomalii şi asupra altor celule din organism se invederează prin apariţia celulelor epiteliale voluminoase în spălăturile gastrice, pe frotiurile vaginale etc.

Alături de alterările hematologice (caracteristice) se înregistrează şi alte simptome: astenie, paloare, dispnee; „sindromul digestiv", cu limbă depapilată, dureroasă, atrofia mucoaselor digestive, aclorhidrie la histamină, afecţiuni neurologice etc.

Administrarea acidului folic are ca rezultat dispariţia macrocitelor şi normalizarea nivelului fierului seric (după 6—10 zile), dar nu ameliorează (eventual chiar agravează) alterările neurologice, în timp ce vitamina B_{12} produce dispariţia completă a macrocitelor (după 2—4 zile), normalizarea fierului seric şi vindecarea tulburărilor neurologice.

2.1.16.8. *INDICAŢII TERAPEUTICE. HIPERVITAMINOZA*

Preparatele de vitamină B_{12} au ca indicaţii majore anemiile: pernicioasă, megaloblastice şi macrocitare carenţiale, toxiinfecţioase, consecutive afecţiunilor digestive, gastrectomiilor extinse etc., cînd se obţin rezultate favorabile cu doze mici (50 μg/zi, timp de o săptămînă). În alte situaţii sînt necesare doze mult mai mari (1—2 mg/zi): în hepatite (epidemice; acute, cronice), în cirozele hepatice şi cînd se urmăreşte efectul lipotrop, anabolizant sau neurostimulant, de exemplu în polinevrite (inclusiv alcoolice), nevralgii ale trigemenului, zona-zooster, astenie; în boala de iradiaţie. În doze terapeutice se recomandă şi în convalescenţă, achilie gastrică, glosite; la imaturi; în distrofiile sugarului, în tulburările de creştere şi în debilitate la copii; în stările generale de denutriţie, în geriatrie, osteoporoză, în intoxicaţiile cu plumb, arsenicale etc.

Doze mari, în administrare prelungită, pot provoca o stare de *hipervitaminoză* manifestată prin poliglobulie; mai rar, pot apare stări de alergie.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.II.2. GRUPUL VITAMINELOR C

2.1.17. ACIDUL ASCORBIC. VITAMINA C. VITAMINA ANTISCORBUTICĂ. ACIDUL HEXURONIC

Boala denumită *scorbut (Enricus Cordus, 1543)* este cunoscută de mult timp, fiind descrisă la soldaţii romani *(Plinius)*, la cruciaţii din Egipt (cronicarul *Joinville, 1249)* şi era foarte răspîndită la marinari (descrisă la echipajul lui Vasco de Gama, 1498) şi la copii *(Th. Barlow, 1883)*. Mulţi medici au intuit natura sa carenţială şi au recomandat pentru prevenire şi tratament alimente proaspete: plante verzi, varză, roşii, frunze de conifere, fructe (citrice), alge etc. *(James Lancaster* dispune introducerea lămîilor în hrana marinarilor, *1601. Nicolas Venette, 1671* şi *Kramer, 1720* propun plantele verzi; *J. Fr. Bachstrom: „Observationes circa scorbutum, ejusdem indolem, causas, signa et curarum", Leyda, 1734; J. Lind: „A treatise of the scurvy, Edimbourgh, 1753; Pallas, 1785)*. Într-un *„tract"* tipărit de oficialitatea din Transilvania *(Dr. F. Nylas, J. Osztrovics, 1785)* se recomandă consumarea verzei crude şi a altor vegetale neprelucrate pentru prevenirea şi vindecarea scorbutului, destul de răspîndit în această parte a ţării noastre. În acelaşi timp se introduc, obligatoriu, lămîile şi alte fructe în regimul flotei britanice *G. Blanc, 1796)* şi, mai tîrziu, se recomandă laptele ca aliment antiscorbutic *(J. B. Dumas, 1871; N. Lunin, 1881)*. Etapa cercetărilor ştiinţifice începe cu observaţia că regimul bogat în făinoase predispune marinarii la scorbut şi că o asemenea alimentaţie determină apariţia scorbutului experimental la cobai şi că acesta poate fi prevenit şi vindecat prin alimentele proaspete, bogate în *„principiul antiscorbutic" (A. Holst, T. Fröhlich, 1907, 1912)*. Acest „principiu antiscorbutic", asimilat cu vitaminele *(C. Funk, 1912)* şi denumit *„factorul hidrosolubil C" (Drummond, 1912)* a fost izolat din sucul de lămîie *(S. S. Zilva, 1923—1925)* şi apoi din suprarenale şi vegetale (ardei, varză) sub forma unui compus cu formula $C_6H_8O_6$, cu caracter acid şi reducător de unde denumirea de *„acid hexuronic" (A. Szent-Györgyi, 1928; J. L. Svirbely, A. Szent-Györgyi, 1932, 1934)*; concomitent i s-a stabilit structura, s-a obţinut prin sinteză *(W. N. Haworth, T. Reichstein, 1928; P. Karrer, 1932; E. G. Cox, 1932; T. Reichstein, A. Grüssner, R. Oppenhauer, 1933)* şi s-a stabilit că aparţine grupului *„reductonelor"* care cuprinde compuşi cu grupări: en-diol, en-diamină, en-amino-ol, tiol-enol şi en-amino-tiol, care reduc reactivul Tillmans şi alţi compuşi cu proprietăţi similare *(Euler, 1934)*.

2.1.17.1. *STRUCTURĂ. PREPARARE. RELAŢII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE". ANALOGI ACTIVI ŞI INACTIVI (ANTIVITAMINE)*

Vitamina C sau *acidul ascorbic* este lactona (ciclu furanic) a acidului ce corespunde gulozei, cu o grupare caracteristică „en-diol" şi reprezintă acidul L-xilo-ascorbic; 3-oxo-L-gulonofuranlactona (F.R. IX); acidul L-threo-3-ceto-hexonic-eno-lactona; acidul L-threo-2, 3, 4, 5, 6-pentahidroxi-2-hexeno-4-lactona *(figura 2.79)*.

Preparare. Metodele de extracţie, bazate în principiu pe separarea sării de plumb şi eliberarea din aceasta cu acizi (de exemplu, sulfuric) sînt înlocuite în prezent prin cele de sinteză. Într-o metodă, cu aplicaţii industriale, se pleacă de la D-glucoză (I) care se reduce catalitic la D-sorbită (II); aceasta se oxidează la L-sorboză (III), de preferat prin metode microbiologice, de exemplu, cu *Acetobacter xilinum* şi la noi în ţară cu *B. suboxidans Romanum* (izolat de pe mure). Diizopropiliden derivatul L-sorbozei (IV) se oxidează cu $KMnO_4$, în mediu neutru, la acidul 2, 3, 4, 6-diacetat-2-cetogulonic (V) care prin încălzire în soluţie apoasă hidrolizează la acidul 2-ceto-L-gulonic; acesta se poate prelucra pe două căi: încălzirea cu acizi în absenţa aerului (*a*), cînd se transformă în acidul L-ascorbic (IX), sau prin esterificare cu metanol şi tratare cu metilat de sodiu (b), cînd se formează ascorbatul de sodiu (VIII) *(fig. 2.80) (T. Reichstein, A. Grüssner, 1934; P. A. Wells, J. J. Stubbs, L. B. Locwood, E. T. Roe, 1937; I. Manta şi colab., 1955)*.

Relaţii „structură-activitate". Analogi. Forme naturale. Activitatea vitaminică necesită integritatea ciclului lactonic (deschiderea sa o inactivează), gruparea „en-diol" şi un lanţ lateral în poziţia 4 cu 2 atomi de C şi —OH de forma L-

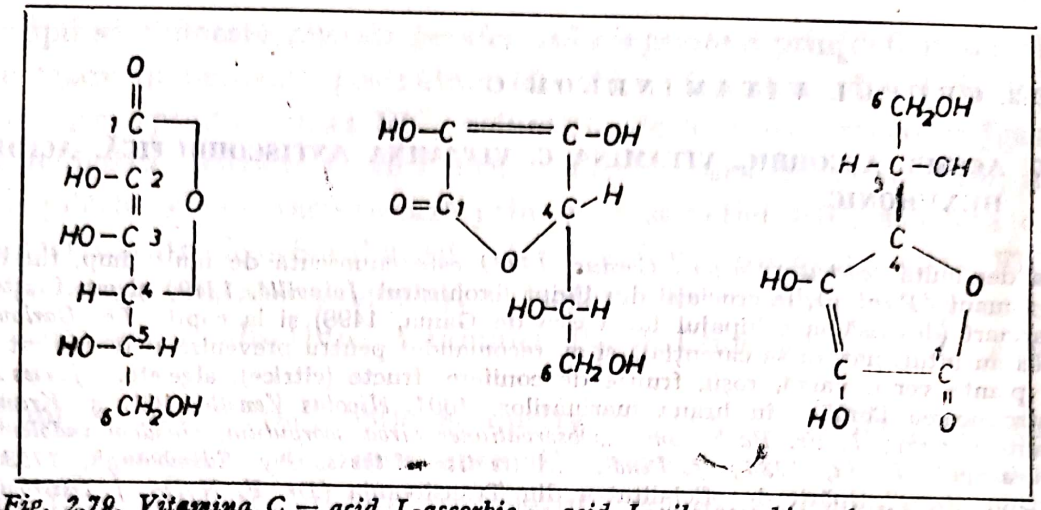


Fig. 2.79. Vitamina C = acid L-ascorbic = acid L-xilo-ascorbic = lactona acidului 2,3-endiol-gulonic = 2,3-didehidro-L-threohexono-1,4-lactona

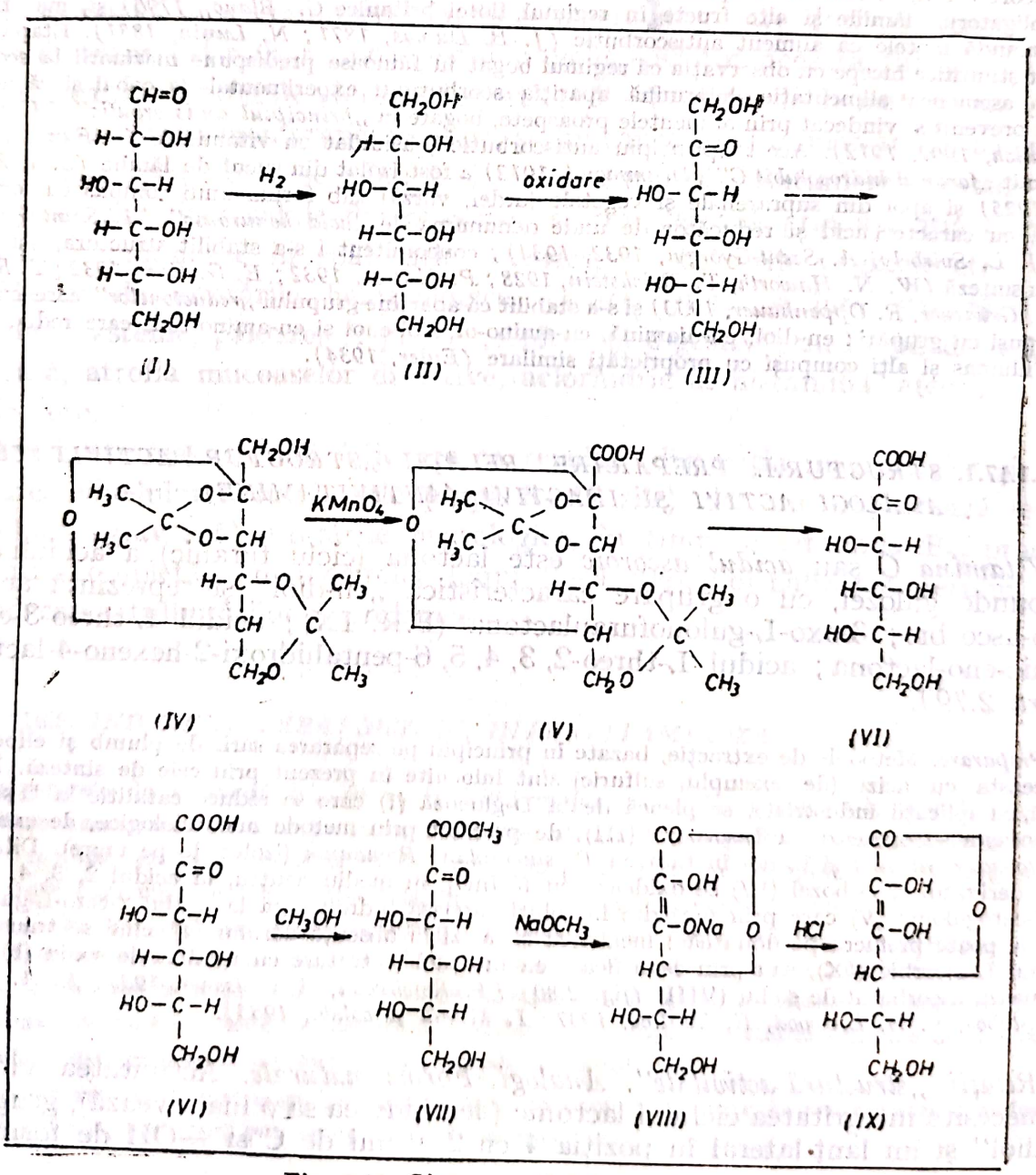


Fig. 2.80. Sinteza acidului ascorbic

Acidul dehidroascorbic, forma de oxidare reversibilă a acidului ascorbic are aceeaşi activitate ca şi acidul L-ascorbic. *Ascorbinogenul (J. Procházka, 1953—1954)*, cu formula $C_{17}H_{19}O_7N$, cu un radical de indol, are 1/3 din activitatea acidului ascorbic; prin sinteză s-a obţinut un compus înrudit, *ascorbinogenul sintetic* cu formula $C_{15}H_{15}O_6N$, cu 1/20 din activitatea vitaminei C *(R. Gmelin, A. I. Virtanen, 1960)*, precum şi *o vastă serie de analogi*, în majoritate cu efecte de antivitamine C *(fig. 2.81)*.

Administrarea antivitaminelor C, de exemplu, a acidului glucoascorbic (cel mai utilizat în acest scop) determină la şobolani, şoareci şi cobai, hrăniţi cu o dietă formată din compuşi purificaţi, încetarea creşterii şi simptome caracteristice scorbutului *(D. W. Wooley; L. O. Krampitz, 1943—1944; B. S. Gould, 1948)*.

În afară de acidul ascorbic liber, în produsele naturale se găsesc şi forme combinate, cum este ascorbinogenul, format din acidul L-ascorbic şi 2-hidroximetilindol, derivat din glucozidul vegetal, glucobrasicină, prin acţiunea mirozinazei; esteri ai acidului ascorbic cu acizii graşi, moo- şi dipalmitoilascorbaţi; esteri cu acidul sulfuric, fosforic etc. *(A. I. Virtanen, 1962; C. G. Mead, F. J. Finamore, 1969; F. Korte, M. Goto, 1977)*. În general, acidul ascorbic şi derivaţii menţionaţi sînt utilizaţi ca aditive alimentare pentru prevenirea alterării aspectelui şi caracterelor organoleptice, pentru evitarea rîncezirii oxidative a grăsimilor (în special sub formă de esteri cu acizii graşi), a îmbrunirii, decolorării şi pierderii gustului fructelor etc. *(H. A. Ketz, 1976)*.

2.1.17.2. *PROPRIETĂŢI FIZICO-CHIMICE*

Acidul ascorbic (3-oxo-L-gulofuranolactona) se prezintă sub formă de cristale incolore sau pulbere cristalină albă, fără miros, cu gust acru; P.T. 188°—192°C (cu descompunere); $[\alpha]_D^{20°}$ = = +21° pînă la +23° (F.R.IX); absorbţia maximă la 254 nm. Este solubil în apă (33 g/100 ml), alcool (3,5 g/100 ml), glicerol (1 g/100 ml), metanol, acetonă; puţin solubil în acetat de etil; practic insolubil în benzen, eter de petrol, cloroform, eter, uleiuri (grase) şi în majoritatea solvenţilor organici (esterii cu acizii graşi sînt solubili în solvenţii organici şi în lipide).

Principala proprietate chimică a acidului ascorbic este caracterul său puternic *reducător*, respectiv uşurinţa cu care se poate oxida. În prima etapă, sub influenţa oxidanţilor slabi (brom, iod, chinone) trece în acidul dehidroascorbic; cu oxidanţi mai puternici ($KMnO_4$, hipoiodaţi), oxidarea continuă la acidul dicetogulonic şi apoi la acid treonic + oxalic şi chiar pînă la CO_2 *(fig. 2.82)*. Prima etapă este reversibilă şi esenţială pentru funcţiile sale biologice în procesele de oxido-reducere; reacţiile în continuare sînt ireversibile şi au loc în organism în cursul metabolizării şi respectiv în formarea produşilor de eliminare *(fig. 2.85)*.

Acidul ascorbic cristalizat este stabil; în soluţie, în domeniul stabilităţii maxime, în jur de pH = = 4 *(E. Gero, P. Le Gallic, 1952)* poate fi conservat timp îndelungat în absenţa aerului (de exemplu, în CO_2) şi prin încălzire la 110°C/20 minute pierde numai 10% din activitatea biologică. Prin expunere la aer la temperatura camerei pierde 35% din activitate, după o zi, şi 75%, după 2 zile; pierderile cresc cu ridicarea temperaturii şi a pH-ului (de exemplu, la pH = 7 se distruge rapid, chiar şi în absenţa aerului). Metalele grele: cuprul, la concentraţii mici (45 μg/litru), la pH 6,7—7,2 şi la temperatura între 50—70°C distrug rapid toată vitamina existentă în soluţie; acidul ascorbic este radiosensibil şi de aceea radiaţiile U.V. şi catodice contribuie la distrugerea vitaminei.

Degradarea anaerobă a acidului ascorbic este catalizată de prezenţa ionilor metalici bi- şi trivalenţi (la pH = 4,0—6,0) în ordinea (descrescătoare): Pb^{2+}, Zn^{2+}, Co^{2+}, Fe^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, Al^{3+}, Cr^{3+}; ionul Cu^{2+} acţionează oxidativ chiar în absenţa aerului la pH peste 2 *(V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

Scanned with OKEN Scanner

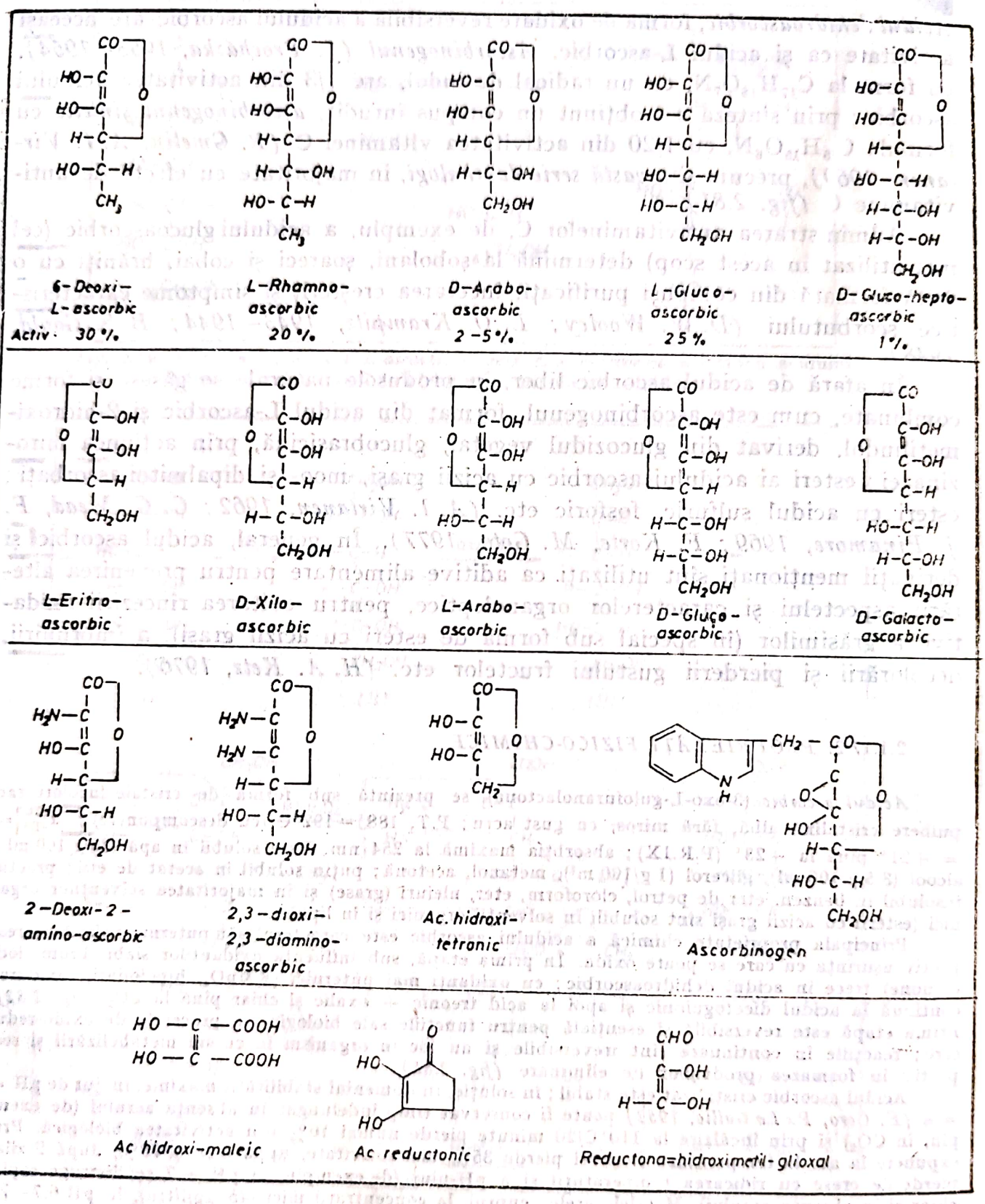


Fig. 2.81. Analogi ai vitaminei C. Antivitamine C.

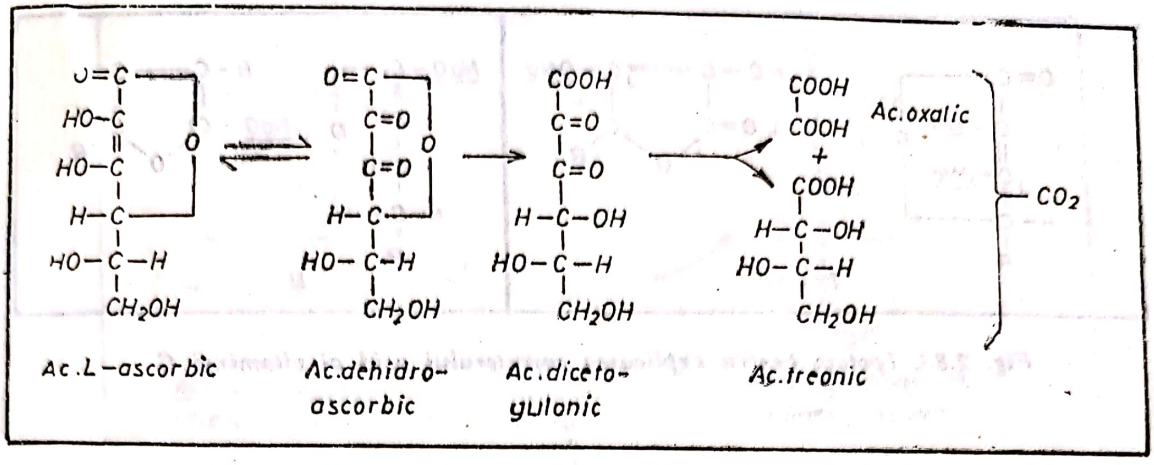
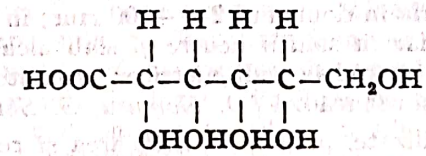


Fig. 2.82. Oxidoreducerea vitaminei C

Datorită sensibilității mari a soluțiilor de vitamină C la oxidanți (aer), ridicarea temperaturii, creșterea pH-ului și la ionii metalelor grele, cu efecte distrugătoare aditive, în practica farmaceutică (și în sectorul alimentar) sînt necesare mijloace de protejare. În acest scop, se utilizează acidul oxalic, un bun stabilizator prin caracterul acid și reducător și de formare a unor complecși mai stabili *(P. Strohecker, W. Hermann, F. Matt, 1955)*; compuși care complexează metalele catalitice distrugătoare: proteine, peptide, aminoacizi (Cis > Ala > Leu > Arg > Trp). Efectul stabilizator optim al cisteinei se datorește și grupărilor —SH, deoarece și alți compuși cu —SH, de exemplu, glutationul redus, au efecte reducătoare, manifestate în transformarea ac. dehidroascorbic la acid ascorbic sau a Cu^{2+} la Cu^{1+}, cu care formează complecși insolubili. Prin mecanisme similare, de formare a complecșilor cu ionii de Cu^{1+} se poate explica și efectul stabilizator al vitaminei B_1 și al vitaminelor C_2 sau P (flavonoide: rutina, quercitina, citrina, care însoțesc vitamina C; *cap. 2.1.18*), efectul 8-hidroxichinoleinei etc., în timp ce carotenii (provitamine A) protejează vitamina C prin efecte antioxigen. Un alt mod de stabilizare este creșterea vîscozității mediului, prin care se împiedică difuziunea oxigenului, de exemplu, în cazul glucidelor: fructoză > maltoză > zaharoză > glucoză; lipidele și uleiurile, deși pot „izola" soluțiile de aer nu protejează vitamina C din cauza prezenței peroxizilor care accelerează distrugerea vitaminei C *(D. E. Green, 1933; S. D. Balahovschi, 1952; A. Bertollucci, N. E. Foss, 1955; J. Davidek, 1960)*.

Prin hidrogenarea parțială a vitaminei C în curent de H_2 la 60 atm. și 35—40°C, în prezență de catalizatori (platină) se obține *acidul idonic*:



O altă caracteristică importantă a acidului ascorbic este *caracterul acid*, cu două trepte de disociere: pK = 4,26 și 11,64. În realitate acidul ascorbic se comportă ca un acid monobazic *(T. N. Birch, L. J. Harris, 1933)* și această proprietate se datorește sistemului „endiol", considerîndu-se că numai una din grupările —OH este implicată în exercitarea efectului acid. Pentru explicarea acestei comportări s-au emis două ipoteze: fixarea cationului, de ex. Na^{1+} la —OH din poziția 3 și respectiv tautomerizarea moleculei cu fixarea Na^{1+} la —OH, ce apare, în acest caz, la C_1 *(fig. 2.83)*.

Sarea de Na a acidului ascorbic este solubilă în apă, alcool, acetonă, în timp ce sarea de Pb este solubilă în apă, dar insolubilă în alcool (proprietate valorificată în izolarea vitaminei C).

Acidul ascorbic prezintă o serie de reacții *comune cu glucidele*, ca transformarea în derivați furfurolici, reacții de reducere, formarea de fenilhidrazone și ozazone *(a se vedea cap. 1.1.3)*

Vitamina C dă o serie de reacții de culoare: cu $FeCl_3$ (violetă), $FeSO_4$ (albastră-violetă), $TiCl_4$ (roșie), fosfomolibdotungstat (violetă), precum și cu o serie de reactivi (indicatori), valorificate ca metode de identificare și/sau dozare *(cap. 2.1.17.3)*.

În *operațiile de manipulare din farmacie*, care implică utilizarea vitaminei C, trebuie să se țină seama de o serie de particularități și incompatibilități ale acestei vitamine.

Soluția 5,04% este izoosmotică cu serul, dar produce o hemoliză de 100% a eritrocitelor în 45 minute cînd amestecul devine negru-brun *(E. R. Hammarland, K. Pedersen-Bjengaard, 1951)*.

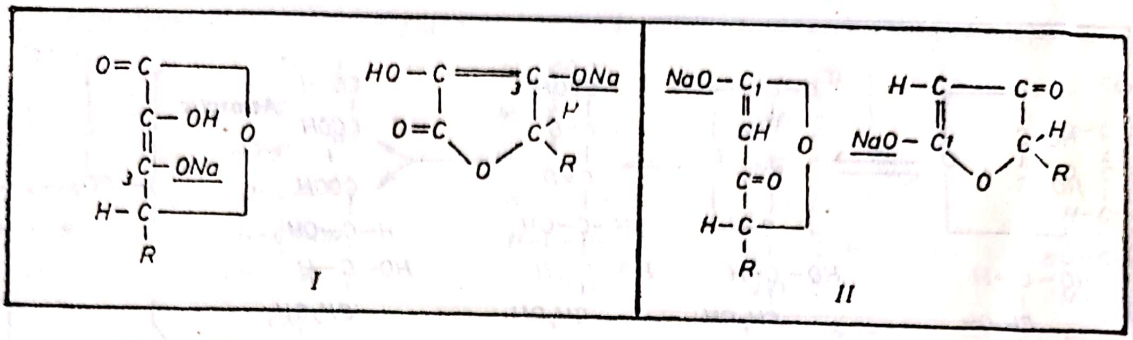


Fig. 2.83. Ipoteze pentru explicarea caracterului acid al vitaminei C

Soluția 5% este acidă (pH = 2,2 — 2,5), iar soluția 1% este atît de acidă că poate descompune carbonații, sărurile amidelor acide, benzoații, teobrominatul și salicilații, cu producerea de precipitate (acid salicilic, benzoic, teobromină) sau cu degajare de CO_2 și transformă penicilina G în acid peniciloic; în mucilagii cu vîscozitate mare, distrugerea este accelerată.

Pentru neutralizarea soluțiilor de acid ascorbic se folosește hidrogencarbonatul de sodiu; soluțiile injectabile vor fi barbotate cu CO_2 care este mai eficient pentru îndepărtarea O_2 dizolvat decît N_2; se poate folosi și fosfatul de sodiu, dar nu trietanolamina. Ca stabilizanți pot fi utilizați pirosulfitul de sodiu, tioureea, propilenglicolul, sorbitolul, iodura de potasiu; soluțiile concentrate sînt mai stabile decît cele diluate și stabilitatea crește în paralel cu concentrația clorurii de sodiu, ca urmare a scăderii concentrației oxigenului dizolvat *(T. J. Macek, 1960; A. Hassem și colab., 1969)*.

Soluția injectabilă de vitamină C este instabilă la cald și de aceea se recomandă tindalizarea sau filtrarea bacteriană a soluțiilor care conțin un adaus din unii antioxidanți (tiouree 0,012%, pirosulfit de sodiu 0,20% sau formaldehidsulfoxilat de sodiu 0,10—0,20%) și a unui agent antimicrobian (clorcresol 0,20% sau clorbutanol 0,35—0,50%), la pH sub 6,4, cînd pierderile sînt minime.

Pentru injecțiile i.v. se pot folosi soluții de acid ascorbic, eventual izotonizate cu clorură de sodiu; soluțiile acide sînt contraindicate în injecțiile i.m. și s.c. și de aceea se recomandă ajustarea pH-ului sau transformarea în săruri solubile *(V. Stănescu, E. Savopol, 1981)*.

2.1.17.3. *METODE DE IDENTIFICARE. DOZARE. TESTE*

Metode fizice: spectrofotometria în domeniul 240—300 nm; în soluții slab acide are un maxim de absorbție la 254 n.m. în U.V., iar în soluții neutre și slab alcaline la 265 nm (dovadă a sistemului „endiol"); spectrele în I.R.; metodele radiometrice; cromatografice; metodele polarografice, aplicabile și în prezența altor compuși reducători *(D. Nomura, S. Shinmoto, 1962; T. Kajita, 1972)*.

Metodele chimice sînt larg utilizate pentru identificarea și respectiv, dozarea vitaminei C în produsele farmaceutice, biologice, alimente.

Identificarea în preparatele farmaceutice recurge, în principal, la două metode: *tratarea soluțiilor de vitamină C cu* HNO_3 10% și $AgNO_3$: precipitat cenușiu și, respectiv, cu *nitroprusiat de Na și NaOH* 10%: coloratie galben-verzuie, care după adăugare de acid acetic 30% trece în albastru, verde și apoi brun; pentru dozare se recomandă titrarea în mediu acid cu iodat de K în prezență de amidon (F.R.IX);

Cu 2,6-diclorfenolindofenol (reactivul Tillmans, 1930), pe baza unei reacții de oxido-reducere, cu schimbarea culorii reactivului (albastru—violet) la pH = 4 *(fig. 2.84)*; este una din metodele cele mai utilizate;

Reacția cu *2,4-dinitrofenilhidrazină* (DNFH), prin care acidul ascorbic se oxidează la acid dehidroascorbic și acid 2,3-diceto-L-gulonic, care formează cu DNFH ozazone colorate ce pot fi determinate la 520—540 nm, servește pentru dozarea acidului ascorbic și dehidroascorbic din sînge, urină și alte produse biologice *(J. H. Roe, E. A. Knether, 1943)*;

Reducerea albastrului de metilen la leucoderivat, cu aplicații în dozarea vitaminei C din produsele naturale și farmaceutice *(E. Martini, A. Bonsignore, 1934)*;

Alte metode folosesc reducerea Fe^{3+} *la* Fe^{2+} și determinarea acestuia din urmă cu α,α'-dipiridil *(E. Schnleck, J. Floderev, 1939)*; reacțiile cu sărurile de uranil, cu sulfamide diazotate, cu nitro-aniline etc.

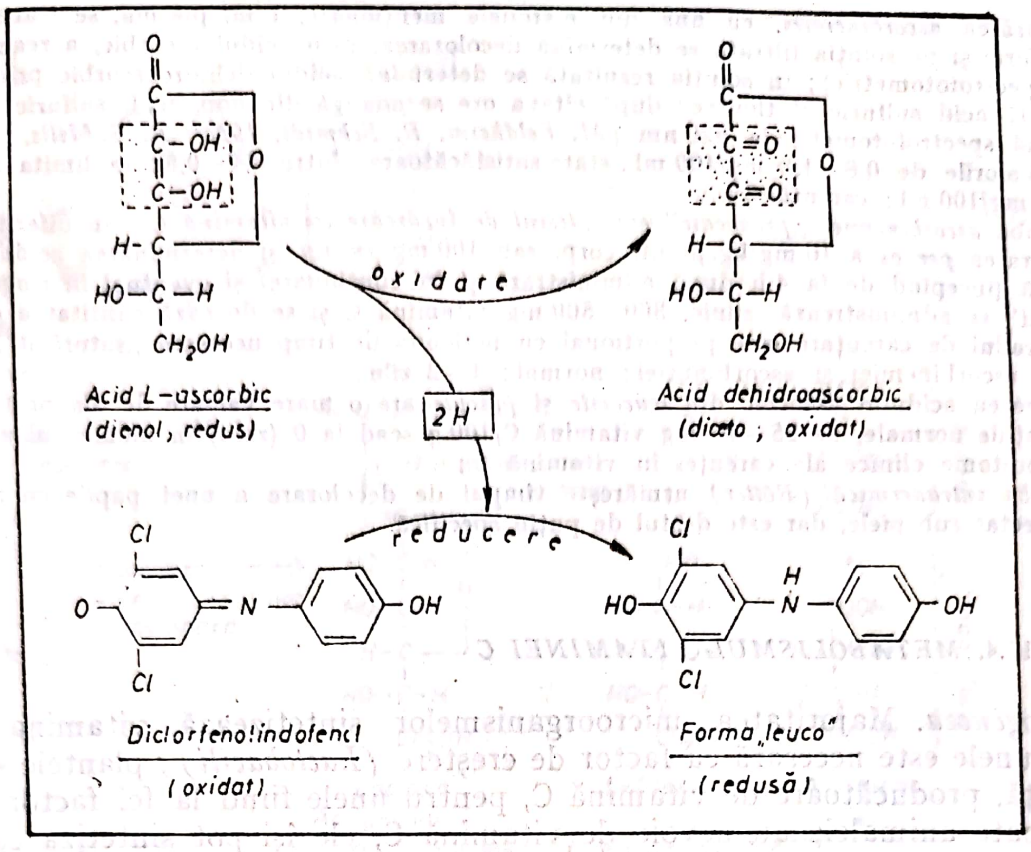


Fig. 2.84. Reacţia vitaminei C cu reactivul Tillmans

Toate aceste reacţii sînt limitate, într-un grad mai mic sau mai mare, de lipsa lor de specificitate deoarece ele interferează cu o serie de compuşi (reducători) prezenţi în produsele biologice şi alimente, ca de exemplu: pigmenţi naturali, compuşi cu sulf (în special cu grupări —SH), „reductone" (care apar prin încălzirea glucidelor în mediu alcalin şi respectiv în alimentele prelucrate, prin reacţia „aminocarbonil" sau „descompunerea Strecker" şi care sînt prezente şi în produşii naturali, ca o consecinţă a unor procese metabolice). Pentru evitarea acestor interferenţe se impune purificarea prealabilă a vitaminei C, prin extragere cu solvenţi organici, precipitări selective, sau prin metode cromatografice, larg aplicate. Rezultate bune se obţin prin cromatografiere pe hîrtie de filtru impregnată cu acid oxalic 2% pe care se efectuează două irigări: prima cu n-butanol: acid oxalic şi a doua cu fenol, urmată de dozarea în eluat cu reactiv Tillmans. O altă metodă convenabilă este cromatografia în strat subţire pe plăci cu silicagel impregnat cu substanţe fluorescente în U.V. (de exemplu, „Leuchstoff-ZS-super"), irigate cu un sistem acid acetic: acetonă: metanol: benzen (5 : 5 : 20 : 70); operaţiile se efectuează la întuneric şi se apreciază spotul vitaminei C în U.V. la 254 nm.

O altă posibilitate de mărire a specificităţii este utilizarea *metodelor enzimatice*. În principiu, se dozează cu o metodă uzuală „puterea reducătoare totală"; se incubează (în probe paralele) cu acid ascorbicoxidaza (care oxidează, specific, numai acidul ascorbic) şi se efectuează o nouă dozare; cantitatea de vitamină C se calculează prin diferenţa între cele două determinări. Se poate aplica şi o metodă inversă: proba se tratează iniţial cu acid ascorbicoxidază şi se determină „puterea reducătoare"; pe o probă similară se adaugă o suspensie de *Escherichia coli* sau *Staphylococcus albus*, care reduc specific acidul dehidroascorbic, format din acidul ascorbic în prima reacţie.

Testele biologice folosesc *cobaiul* (singurul animal de laborator sensibil la carenţa în vitamină C) în două variante: *testul preventiv* care stabileşte cantitatea minimă de vitamină C capabilă să prevină apariţia scorbutului şi *testul curativ*, care determină necesarul minim pentru vindecarea scorbutului instalat în prealabil şi pentru normalizarea curbei greutăţii corporale.

Metode biochimice şi clinice. Scăderea activităţii *fosfatazei alcaline* în scorbut (în rahitism nivelul său creşte) poate servi pentru aprecierea carenţei în vitamină C şi a eficienţei vitaminei administrate *(C. Gould, H. Schwachman, 1943)*; Dozarea *ascorbinuriei*: la urină se adaugă imediat după emisie HCl 3%, se diluează cu tampon pH 4 şi se efectuează o dozare cu metodele uzuale, cu reactivul Tillmans; valorile nule sau scăzute indică o stare de carenţă.

Scanned with OKEN Scanner

Dozarea *ascorbinemiei*, cu una din metodele menționate, 1 ml plasmă, se tratează cu acid metafosforic și pe soluția filtrată se determină decolorarea, prin acidul ascorbic, a reactivului Tillmans (spectrofotometric); în soluția rezultată se determină acidul dehidroascorbic prin tratare cu 2,4-DNFH acid sulfuric și tiouree; după cîteva ore se adaugă din nou acid sulfuric conc. și se determină spectrofotometric la 520 nm *(M. Feldheim, R. Schmidt, 1956; R. S. Mills, D. N. Raine, 1966)*. Valorile de 0,8—1,2 mg/100 ml: stare satisfăcătoare; între 0,4—0,8: la limita normalului; sub 0,4 mg/100 ml: carență C;

Proba *ascorbinemiei „provocate"* sau *„testul de încărcare cu vitamină C"*, în diferite variante: administrarea *per os* a 10 mg/kg. greut. corp. sau 100 mg *inj.i.v.* și determinarea acidului ascorbic din urină (începînd de la 4 h după administrare și în continuare) și eventual în sînge. În testul „saturării" se administrează, zilnic, 300—500 mg vitamină C și se dozează cantitatea din sînge și urină; gradul de carențare este proporțional cu perioada de timp necesară „saturării", adică normalizării ascorbinemiei și ascorbinuriei; normal: 1—2 zile;

Dozarea acidului ascorbic din *leucocite* și *plăcuțe* are o mare valoare de diagnostic, deoarece concentrațiile normale, de 25—40 mg vitamină C/100 g scad la 0 (zero) în momentul apariției primelor simptome clinice ale carenței în vitamină C;

Proba intradermică (Rötter) urmărește timpul de decolorare a unei papile cu reactiv Tillmans injectat sub piele, dar este destul de puțin specifică.

2.1.17.4. *METABOLISMUL VITAMINEI C*

Biogeneza. Majoritatea microorganismelor sintetizează vitamina C, dar pentru unele este necesară ca factor de creștere *(Lactobacili)*; plantele sînt, prin excelență, producătoare de vitamină C, pentru unele fiind la fel factor de creștere. Toate animalele au nevoie de vitamină C, ele își pot sintetiza cantitățile necesare și anume: mamiferele în ficat; păsările, amfibienii, reptilele în rinichi. Excepție fac *omul*, (primatele), cobaiul și încă cîteva alte specii (unele păsări și mamifere provenite din regiunile tropicale, de exemplu, căprioara) care nu pot sintetiza vitamina C și sînt astfel tributare aportului exogen.

Înrudirea structurală cu ozele și utilizarea moleculelor marcate au relevat că formele D a numeroase oze, ca D-glucoză, D-fructoză, D-manoză, D-galactoză, servesc ca precursori ai vitaminei C la plante și animale *(R. A. Peters și colab., 1954; F. A. Löwus și colab., 1956, 1961, 1962)*. Cercetările cu glucoză sau galactoză, dublu marcate ($^{14}C_1$ și $^{14}C_6$), pe șobolanii tratați în prealabil cu cloretonă (1,1,1-triclor-2-metil-2-propan), stimulator al producției, au relevat formarea acidului ascorbic prin șuntul „pentozofosfatic", mai precis, pe calea „acid glucuronic-xiluloză", sau *„ciclul Touster"* și s-au precizat căile de metabolizare diferite din microzomi și citosol *(fig. 2.85)*. Totodată s-a constatat că omul și animalele tributare aportului exogen de vitamină C se opresc la unii intermediari, la acidul glucuronic, deoarece nu posedă enzimele din etapele terminale, de exemplu, L-gulonooxidaza. Căile de formare ale acidului glucuronic și inducția UDP-glucuronatdehidrogenazei sau a glucuroniltransferazei, implicate în mecanismele sale de conjugare, sînt puternic stimulate sub acțiunea a numeroși compuși endogeni: metaboliți ai hormonilor, aminoacizi, bilirubină etc. și xenobiotici (străini): medicamente cu structuri și acțiuni farmacologic-terapeutice diferite, ca anestezice, hipnotice, analgezice, antireumatice etc. sau agenți poluanți, cum sînt substanțele cancerigene, fumatul, insecticidele etc. Aceste stimulări (inducție enzimatică) constituie un exemplu ilustrativ de mecanisme adaptative, de apărare generală a mamiferelor, inclusiv ale omului, față de metaboliții toxici (reacții de detoxefiere) și ca o cale, mai limitată, de formare a acidului ascorbic, care nu s-a dezvoltat la om și la alte primate *(E. H. Mosbach; J. J. Burns; C. G. King; G. J. Dutton; N. Greenberg; C. Evans; H. H. Horowitz; G. M. Brown*

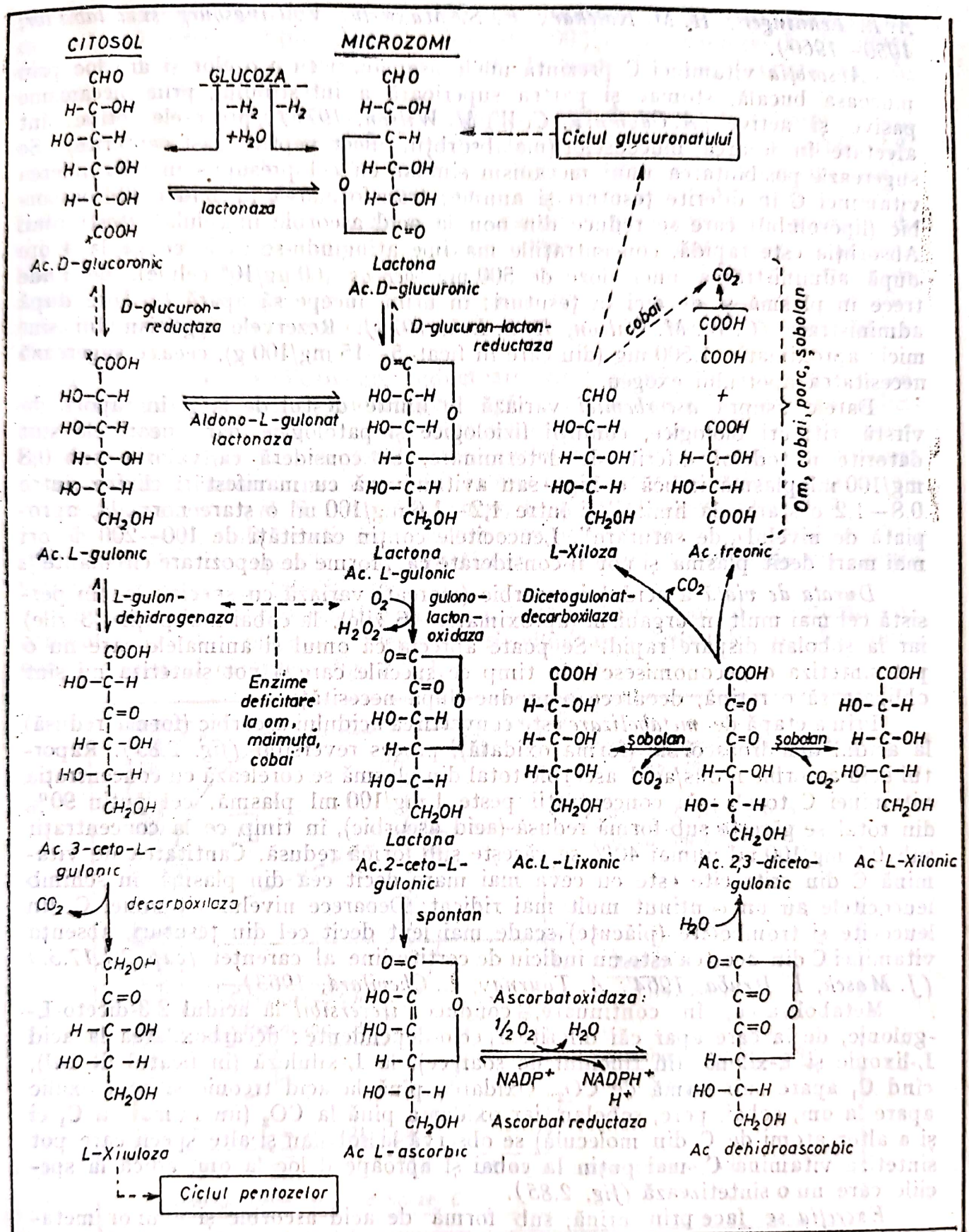


Fig. 2.85. Biosinteza și catabolismul vitaminei C

A. L. Lehninger; H. M. Kalckar; E. S. Maxwell; V. Gingsburg și colab. lor, 1950—1960).

Absorbția vitaminei C prezintă unele asemănări cu a ozelor și are loc prin mucoasa bucală, stomac și partea superioară a intestinului, prin mecanisme pasive și active *(A. Odomusu, C. W. M. Wilson, 1971)*; procesele active sînt afectate în lezarea mucoaselor (malabsorbții, ulcer peptic, gastroenterite). Se sugerează posibilitatea unui mecanism similar cu cel presupus în pătrunderea vitaminei C în diferite țesuturi și anume: transformarea în acid dehidroascorbic (liposolubil) care se reduce din nou la acid ascorbic în celula intestinului. Absorbția este rapidă, concentrațiile maxime atingîndu-se în leucocite la 4 ore după administrarea unei doze de 500 mg *per os* (60 μg/10^8 celule), de unde trece în plasmă și de aici în țesuturi; în urină începe să apară la 3 ore după administrare *(C. W. M. Wilson, H. S. Loh, 1974)*. Rezervele organismului sînt mici: aproximativ 1.500 mg (din care în ficat 5—15 mg/100 g), ceea ce sugerează necesitatea aportului exogen.

Datele asupra *ascorbemiei* variază în limite destul de largi în raport de vîrstă, ritmuri biologice, condiții fiziologice și patologice, dar uneori ele sînt datorite metodelor diferite de determinare. Se consideră că valorile sub 0,8 mg/100 ml plasmă indică o hipo- sau avitaminoză cu manifestări clinice, între 0,8—1,2 o stare „la limită" și între 1,2—1,6 mg/100 ml o stare normală, apropiată de nivelul „de saturare". Leucocitele conțin cantități de 100—200 de ori mai mari decît plasma și pot fi considerate ca „forme de depozitare circulante".

Durata de viață a acidului ascorbic (marcat) variază cu specia: la om persistă cel mai mult în organism (aproximativ 16 zile), la cobai mai puțin (3 zile) iar la șobolan dispare rapid. Se poate aprecia că omul și animalele care nu o pot sintetiza o „economisesc", în timp ce speciile care o pot sintetiza nu sînt obligate să o rețină, deoarece o produc după necesități.

Prima etapă de *metabolizare* este convertirea acidului ascorbic (forma redusă) la acidul dehidroascorbic (forma oxidată), proces reversibil *(fig. 2.85)*. Raportul acid ascorbic redus/acid ascorbic total din plasmă se corelează cu concentrația vitaminei C totale; la concentrații peste 1 mg/100 ml plasmă, cel puțin 90% din total se găsește sub formă redusă (acid ascorbic), în timp ce la concentrații sub 0,3 mg/100 ml numai 40% se găsește sub formă redusă. Cantitatea de vitamină C din eritrocite este cu ceva mai mare decît cea din plasmă, în schimb leucocitele au un conținut mult mai ridicat. Deoarece nivelul vitaminei C din leucocite și trombocite (plăcuțe) scade mai lent decît cel din țesuturi, absența vitaminei C din acestea este un indiciu de certitudine al carenței *(cap. 2.1.17.3.) (J. Masck, F. Hruba, 1964; A. Tournay, L. Chevilard, 1963)*.

Metabolizarea, în continuare, conduce *ireversibil* la acidul 2,3-diceto-L-gulonic, de la care apar căi diferite specio-dependente: decarboxilarea la acid L-lixonic și L-xilonic (în rinichiul de șoarece), la L-xiluloză (în ficatul de cal), cînd C_1 apare sub formă de CO_2. Oxidarea pînă la acid treonic și acid oxalic apare la om, cobai, porc, șobolan, iar oxidarea pînă la CO_2 (nu numai a C_1 ci și a altor atomi de C din moleculă) se observă la șobolan și alte specii care pot sintetiza vitamina C, mai puțin la cobai și aproape deloc la om, adică la speciile care nu o sintetizează *(fig. 2.85)*.

Excreția se face prin urină, sub formă de acid ascorbic și a unor metaboliți diferiți (cantitativ și calitativ) în raport de doză și specie. Rinichiul prezintă un „prag de eliminare" situat la 1,1—1,8 mg/100 ml plasmă. Excreția implică filtrarea glomerulară și reabsorbția activă tubulară, etapă limitantă a

vitezei maximale. La doze de 40—100 mg vitamină C, filtrarea glomerulară este scăzută şi reabsorbţia tubulară mare (97—99%), cu o excreţie de 20—60% din cantitatea administrată; la un aport de peste 100 mg, excreţia este, în condiţii normale, de 60—80%.

La aceeaşi specie, formele de eliminare depind de doză, de exemplu, omul cu rezerve normale de vitamină C excretă acizii ascorbic, dehidroascorbic, 2,3-dicetogulonic şi oxalic (acesta reprezintă aproximativ 40% din acidul oxalic urinar); în carenţă, excreţia este aproape în întregime sub formă de metaboliţi, lipsind acidul ascorbic. În cazul consumării unor cantităţi anormal de ridicate (nejustificate), cînd depozitul leucocitar este complet saturat şi nivelele plasmatice foarte crescute, pe lîngă pierderea vitaminei C excedentare poate apare oxalurie cu agravarea, la persoanele predispuse, a formării calculilor (oxalaţi, uraţi) şi creşterea eliminării de cistină la persoanele cu tendinţă la cistinurie.

În terapia cu medicamente inductoare ale enzimelor de formare ale acidului glucuronic şi/sau a glucuronoconjugării, ca de exemplu, aspirină, salicilaţi, piramidon, barbiturice etc. se constată o creştere a eliminării acidului ascorbic, care poate duce la o depletiţie a rezervelor de vitamină C, fără a declanşa însă scorbutul, datorită mecanismului intens de reabsorbţie tubulară la nivele plasmatice scăzute *(H. S. Loh, K. Watters, C. W. H. Wilson, 1973, 1974)*.

O cale neglijabilă de eliminare la om este prin plămîni (sub formă de CO_2) spre deosebire de speciile care sintetizează vitamina C. Fecalele nu conţin vitamină C şi/sau metaboliţii săi.

De interes clinic sînt relaţiile care se pot stabili între aportul de vitamină C, concentraţiile din plasmă şi leucocite şi eliminarea urinară, care determină corect domeniul carenţei *(fig. 2.86)*.

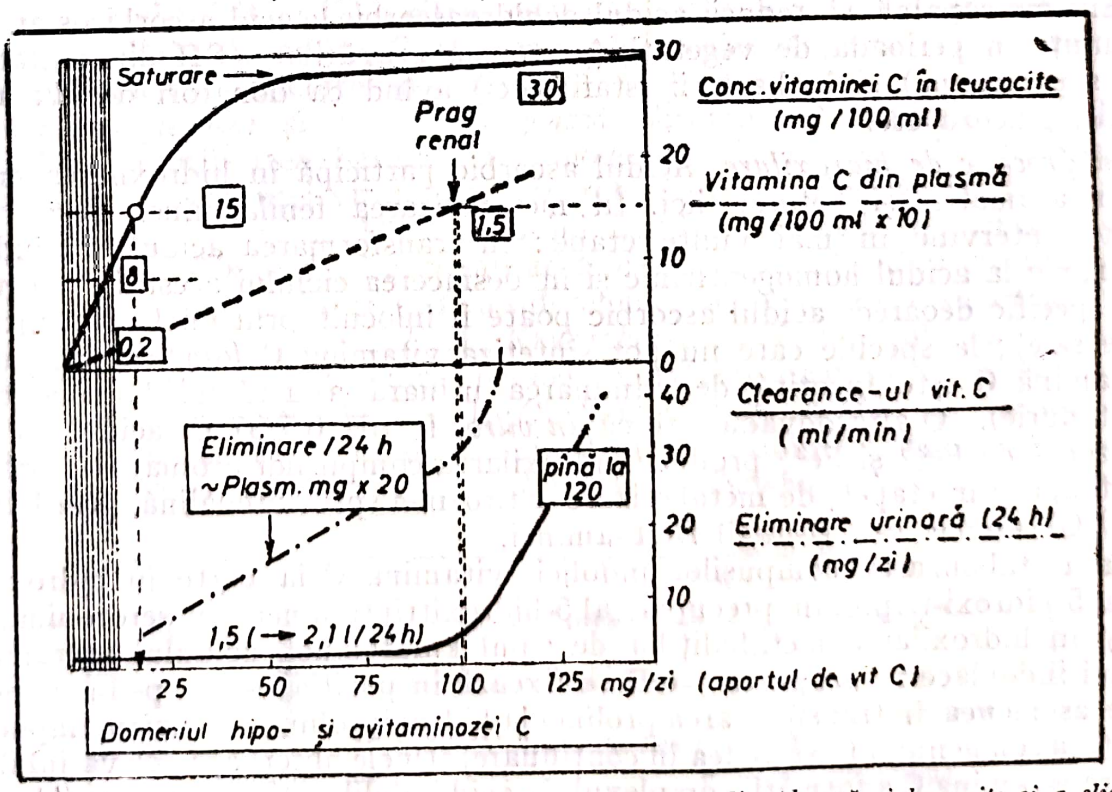
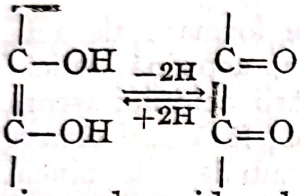


Fig. 2.86. Relaţii între aportul de vitamină C, concentraţia din plasmă şi leucocite şi a eliminării urinare în stabilirea domeniului hipo- şi avitaminozei C (haşurat) şi a stărilor normale (după H. Aebi, 1971)

2.1.17.5. *ROL BIOCHIMIC. INTERRELAȚII METABOLICE*

Vitamina C joacă un rol esențial în hematopoeză, în metabolismul și funcțiile creierului, ficatului, glandelor endocrine (biosinteza hormonilor steroizi) etc., fiind implicată în metabolismul acizilor grași, colesterolului, proteinelor și lipoproteinelor, în formarea și menținerea integrității colagenului, în controlul metabolismului glucidic, în creștere, considerîndu-se că stimularea creșterii ce urmează administrării suplimentare de vitamină C este asociată cu procese energodependente caracterizate prin reținerea și utilizarea mai intensă a vitaminei C în țesuturi *(A. Sigal, C. G. King, 1936; S. Stoicesco, N. Gingold, 1936; C. W. M. Wilson, 1974; E. Cameron, L. Pauling, B. Leibovitz, 1979)*.

În oxidoreduceri. Sistemul acid ascorbic/acid dehidroascorbic:



este implicat în lanțul transportor de electroni și alte mecanisme de oxidoreducere. *In vitro*, oxidarea are loc prin simplă expunere la aer și este intensificată prin Cu^{2+}, Fe^{3+}, chinone, tiroxină *(cap. 2.1.17.2.)*. În condițiile biologice intervin sistemele enzimatice, de exemplu, peroxidaza, fenoloxidaza, citocromoxidaza etc.; o enzimă specifică este *ascorbaza* sau *acid ascorbic-oxidaza* (E.C.1.10.3.31), obținută cristalizată din castraveți, cu 0,25% Cu. Acționează prin formarea unui radical liber, ca intermediar, și este capabilă să oxideze și compușii înrudiți, de exemplu, acizii L-gluco- și araboascorbic.

Enzime capabile să reducă acidul dehidroascorbic la acid ascorbic s-au găsit în semințe în perioada de vegetație (pe seama grupărilor —SH din glutationul redus sau cisteină) și în bacterii (stafilococi) avînd ca donatori de H: acidul succinic, glucoza etc.

În procesele de hidroxilare. Acidul ascorbic participă în hidroxilarea aminoacizilor aromatici și heterociclici. În metabolizarea fenilalaninei, respectiv a tirozinei intervine în mai multe etape: în transformarea acidului p-hidroxifenilpiruvic la acidul homogentizinic și în desfacerea ciclului acestuia (efect mai puțin specific deoarece acidul ascorbic poate fi înlocuit prin unele din antivitaminele sale); la speciile care nu pot sintetiza vitamina C (om, cobai), carența în vitamină C este însoțită de eliminarea urinară a acidului homogentizinic (alcaptonurie). O altă dovadă este că *in vitro*, la pH 6,7/37°C, acidul ascorbic, în prezență de Fe^{2+} și Fe^{3+} produce hidroxilarea compușilor aromatici. Vitamina C participă și în etapele de metabolizare a tirozinei spre adrenalină, prin hidroxilarea DOP-aminei sau N-metil-DOP-aminei.

În metabolizarea compușilor indolici, vitamina C ia parte în hidroxilarea Trp la 5-hidroxi-triptofan, precursor al 5-hidroxitriptaminei sau serotonina, precum și în hidroxilarea metaboliților de tipul kinureninei, acidului antranilic, a acidului indolilacetic; gruparea —OH se fixează în poziția o- sau p- în raport de N; de asemenea, în transformarea prolinei la hidroxiprolină, mecanism implicat în biosinteza colagenului (a se vedea în continuare). Unele observații relevă inhibarea de către vitamina C a formării complexului „acid indolilacetic — proteine" la plante și inhibarea de către auxine (derivați indolici) a efectelor acidului ascorbic *in vitro* dar încă nu se cunoaște semnificația biologică a acestor procese.

Scanned with OKEN Scanner

De mare interes este rolul vitaminei C în sistemele de hidroxilare ale steroizilor, în formarea hormonilor steroizi activi, în desaturarea acizilor graşi saturaţi la acizi mononesaturaţi şi în biotransformarea compuşilor străini, inclusiv a medicamentelor şi a agenţilor cancerigeni.

La elucidarea mecanismului de acţiune a acidului ascorbic în lanţul transportor de e^- şi în hidroxilarea metaboliţilor endogeni şi xenobiotici (medicamente şi alţi compuşi „străini"), caracterizată prin insensibilitatea la -CN *(Kerstin, Staudinger)*, a contribuit separarea sistemelor de oxidare purificate din microzomi (hepatici, renali) în două componente: unul care catalizează reacţia între NADH+H şi acidul monodehidroascorbic (cu o enzimă de natură flavinică) şi celălalt, care produce oxidarea acidului ascorbic prin O_2 (molecular), prin enzime de tipul ascorbatoxidazei, care pot fi înlocuite cu citocromul b_5 *(fig. 2.87)*.

Considerînd că sistemul oxidazelor cu funcţiuni mixte microzomiale („OFMM") cuprinde două segmente transportoare de e^- se sugerează că în lanţul care implică cit. P_{450}, acidul dehidroascorbic poate servi ca acceptor de e^- situîndu-se între cit. P_{450} şi O_2, dar, rolul său major se înregistrează în lanţul cu cit. b_5, pe care îl poate reduce, contribuind astfel la aproximativ 30% din nivelul de funcţionare al „OFMM". În plus, prin corelaţia cu lanţul de biosinteză a acidului glucuronic, acidul ascorbic participă şi în conjugarea metaboliţilor compuşilor endogeni şi xenobiotici, în scop de eliminare *(D. Bedeleanu, M. Kory, 1976)*.

În metabolismul glucidic. La animalele carenţate în vitamina C, hormonii corticosuprarenali nu stimulează neoglucogeneza (ceea ce sugerează necesitatea vitaminei C pentru biosinteza şi/sau acţiunea acestora) şi se înregistrează alterarea ciclului citric, ilustrată prin formarea unui exces de acid α-ceto-glutaric, în cazul administrării acidului citric, succinic, malic (aceste alterări pot fi corectate prin insulină). Vitamina C este necesară şi în alte etape de reglare ale metabolismului glucidic, alterate în cancer.

În ciclul fierului şi hemoglobinogeneză. Vitamina C manifestă o influenţă remarcabilă în utilizarea fierului în hemoglobinogeneză *(vol. II)*; între semnele caracteristice ale carenţei vitaminei C se relevă hemoragiile, scăderea numărului de eritrocite şi scăderea la 1/3 a nivelului fierului plasmatic la maimuţa carenţată *(Greenberg, Rinehart)*. La cobai, administrarea simultană a vitaminei C cu sărurile de fier determină o creştere a sideremiei şi ascorbinemiei, superioară administrării vitaminei C singure *(F. A. Kruchakova, 1955)*; la şobolanii cu anemie experimentală, ritmul regenerării hemoglobinei este maxim în asocierea sărurilor de fier cu vitaminele C şi E *(S. E. Greenberg, 1957)*. La persoanele cu hipohemoglobinemie şi sideremie, administrarea vitaminei C produce corectarea acestor parametri alteraţi *(K. K. Bagghi, S. Chowhury, 1955)*, sugerîndu-se

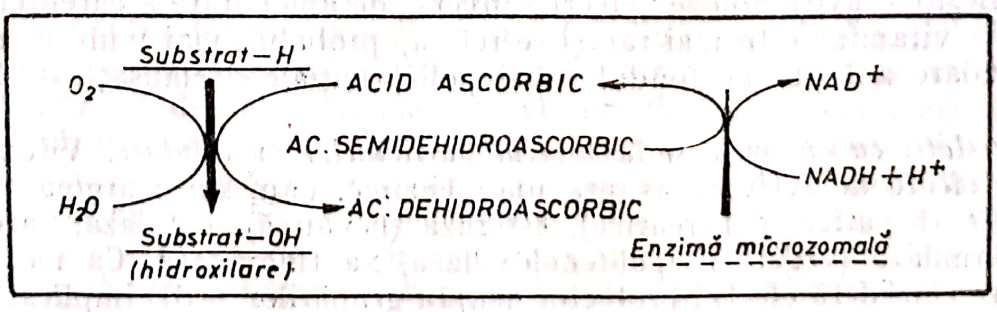


Fig. 2.87. Poziţia vitaminei C în hidroxilarea substratelor

implicarea vitaminei C în transportul fierului, ca siderofilină și în depozitarea hepatică, sub formă de feritină *(Mazur, 1960)*.

Interrelații vitaminice. Vitamina C în doze mari (2—3 g/zi) ameliorează simptomele carențiale determinate de lipsa diferitelor vitamine. Astfel, normalizează nivelul triptofanului din carența riboflavinei; suprimă tulburările endocrine și de creștere din carența acidului pantotenic, dar nu vindecă alterările dermice. Vitamina C protejează șobolanul de consecințele carenței în vitamină B_1; se consideră că atît carența în vitamina C cît și B_1 reduc capacitatea de fosforilare oxidativă și că ambele vitamine au putere reducătoare în țesuturi și se pot substitui între ele *(J. Vinas-Espin, 1952; F. S. Daft, K. Schwartz, 1958)*. Administrarea vitaminei B_1 sau B_2 nu influențează evoluția scorbutului și în carența B_1 nu se constată modificări ale nivelului ascorbemiei. Carența sau excesul de vitamină P.P. nu influențează cantitatea de vitamină C din ficat sau corticosuprarenale (c.s.r.), dar un complex „acid ascorbic-nicotinamidă" denumit *niscorbamină* ar fi mai eficient decît acidul ascorbic singur în asigurarea rezervelor de vitamină C din aceste țesuturi (*H. Chalopin*, 1956). Vitamina C ameliorează, parțial, carența biotinică; invers, în carența biotinică, unele cercetări susțin creșterea cantității de vitamină C din ficat și *c.s.r.*, în timp ce altele duc la concluzii opuse, semnalînd scăderea vitaminei C din țesuturi, cu afectarea metabolismului glucidic *(E. Terroine, 1954; A. Bonomolo, 1958; E. Grana, L. Lilla, 1960; Gh. Chiera, L. Ababei, M. Cotrău și colab., 1969)*. Relațiile strînse cu acizii folici/folinici se relevă prin participarea vitaminei C în convertirea acidului folic la forma 5-formilată (leucovorină); în creșterea excreției acizilor folici/folinici; în efectul favorabil la șobolanii și puii carențați, dar fără a vindeca anemia. Acidul ascorbic este eficient și în stimularea creșterii în carența B_{12} *(M. Kodicecк, 1949)*.

Corelații tot atît de strînse apar și cu vitaminele liposolubile: vitamina C crește nivelul vitaminemiei A; în carența vitaminei A scade concentrația vitaminei C din plasmă și țesuturi, iar în hipervitaminoza A scade nivelul acidului ascorbic și dehidroascorbic din sîngele, ficatul și creierul șobolanilor și cobailor, dar, la om, se pare că nu se produc alterări ale nivelului vitaminei C din țesuturi. „Echilibrul" între vitaminele C, D și calciu este o condiție esențială a dezvoltării osului, de aceea insuficiența sau excesul unuia din acești factori duce la afectarea osificării și dentiției *(I. Grant, 1926; P. H. Phillips, 1938; P. H. King, 1942; B. B. Simic, H. M. Sinclair, B. B. Lloyd, 1953)*. Vitamina E determină creșterea importantă a vitaminei C din ficat și suprarenale la cobai, iar vitamina C are o acțiune puternică de protejare față de apariția a numeroase simptome ale carenței în vitamină E. *(H. Dam. I. Cruse, 1948; G. Cimino, A. A. Bernardini, 1951)*.

Este de relevat că vitamina C manifestă, în general, efecte protectoare față de diferitele avitaminoze; efectul invers, de ameliorare a carenței vitaminei C prin alte vitamine este mai rar și se referă, probabil, mai mult la unele alterări secundare apărute pe fondul stării policarențiale declanșată de lipsa vitaminei C.

Interrelații cu enzimele și la nivelul particulelor subcelulare. Vitamina C, *in vitro*, are efecte de activare asupra unor enzime, cum sînt: arginaza, papaina, β-amilazele (hepatice, pancreatice), esteraza (hepatică), catalaza, catepsinele și inhibă β-amilaza (vegetală), polifenoloxidaza, xantinoxidaza. Ca mecanisme de activare se consideră efectul protector asupra grupărilor —SH implicate în numeroase reacții enzimatice: activarea papainei și arginazei are loc numai în pre-

zenţa ionilor Fe^{2+}, sugerîndu-se formarea unui complex „acid ascorbic-Fe^{2+}", capabil să reducă grupările —S—S— la —SH (active); o altă posibilitate este sustragerea unor ioni care blochează grupările —SH.

Vitamina C ia parte în reglarea numărului şi în funcţiile şi/sau structura lizozomilor. În carenţa vitaminei C, se observă o stimulare a funcţiilor „digestive" a lizozomilor, prin labilizarea membranelor lor, cu creşterea importantă a activităţii ribonucleazelor, dezoxiribonucleazelor, fosfatazelor acide etc., care explică o serie de tulburări degenerative scorbutice; administrarea gonadotrofinelor serice la cobaiul cu scorbut, contracarează aceste alterări. Fibra muşchilor scheletici, în condiţii de avitaminoză C, manifestă o permeabilitate crescută şi este invadată de macrofagi (de origine sanguină) a căror enzime lizozomale exercită a acţiune catabolică, ce explică starea hemoragică a acestora; în controlul integrităţii fibrei musculare, alături de vitamina C, participă şi vitaminele E, A, şi acidul folic. Creşterea permeabilităţii vasculare, caracteristică scorbutului, se poate atribui deficitului de sinteză şi stabilitate a colagenului şi/sau eliberării anormale a unor proteaze din lizozomi *(A. L. Tappel, H. Zalakin, 1962; T. Terroine, Y. Hittier şi colab., 1970; M. P. Dieter, 1970)*.

Alte implicaţii ale vitaminei C în sistemele enzimatice rezultă din observarea scăderii, în carenţa vitaminei C, a activităţii succindehidrogenazei şi citocromoxidazei (enzime mitocondriale), a hidroxilazelor (enzime microzomiale), precum şi a fosfatazelor alcaline (din os, sînge), a fosforilazelor şi esterazelor *(G. H. Bourne, 1943)*.

Mitocondriile (bogate în acid ascorbic) depind, structural şi funcţional de conţinutul lor în vitamină C. În cazul cantităţilor mici (0,3 mμ g) apare, *in vitro*, umflarea şi chiar liza mitocondriilor; aceste alterări sînt împiedicate de concentraţiile mari de acid ascorbic şi de alţi antioxidanţi, sugerînd că liza mitocondriilor este determinată de peroxidarea lipidelor membranare *(J. M. Roux, 1958; E. P. Hunter, A. Scott, 1964; E. Degwitz, H. Staudinger, 1965)*.

O serie de date ilustrează participarea acidului ascorbic la mamifere în lanţul transportor de e^- din microzomi, în etapa dintre NADH şi citocromul b_5, cuplată cu procesele de hidroxilare.

Administrarea alcoolului etilic deplasează, în ficatul de şobolan, echilibrul NAD/NADH în favoarea NADH şi lactat/piruvat, în favoarea lactatului. Efecte similare, de deplasare a echilibrului spre formele reduse se înregistrează şi în raportul acid ascorbic/acid dehidroascorbic din plasma umană; de exemplu la o persoană la care acidul ascorbic din plasmă se găseşte, normal, sub formă redusă în proporţie de 40%, la o alcoolemie de 125 mg/100 ml, forma redusă creşte la valori de peste 90% *(M. E. Smith, H. W. Newman, 1959; O. A. Forsander, 1966)*.

Interelaţii cu hormonii. Importanţa vitaminei C în biosinteza hormonilor din corticosuprarenale (c.s.r.) rezultă dintr-o serie de date clinice şi experimentale de ex. cantitatea foarte mare de vitamină C din c.s.r. (4—5 mg/g). Injectarea ACTH scade conţinutul acidului ascorbic din c.s.r., în paralel cu creşterea biogenezei hormonilor din această glandă; stressurile (frig, infecţii, agenţi chimici etc.), care solicită c.s.r. şi producţia lor hormonală, cresc necesităţile în vitamină C. S-a sugerat, astfel, că vitamina C controlează, în mare măsură, biosinteza hormonilor steroizi c.s.r. şi sexuali. Animalele carenţate în vitamină C au o capacitate scăzută de biosinteză a hormonilor steroizi totali şi, în mod special, a etapelor de convertire a hormonilor de tip dezoxicorticosteronă. Acest deficit este ilustrat *in vivo* prin creşterea nivelului sanguin şi a excreţiei urinare

a 17-cetosteroizilor la cobai şi *in vitro* prin pierderea capacităţii omogenatelor de c.s.r. de a oxida Δ-3-β-ol steroizii la Δ-3-ceto-hormonii corespunzători, în paralel cu gradul de instalare a carenţei în vitamină C, precum şi inhibarea C-11-β- şi C-21-hidroxilazelor, cu cantităţi mici (catalitice) de acid ascorbic. Raportul NAD/NADH, care determină activitatea dehidrogenazelor implicate în biosinteza hormonilor steroizi este controlat de către mono-dihidroascorbat-transhidrogenază, enzimă izolată din microzomii c.s.r. de porc şi ai ficatului de şoarece. În timp ce NAD^+ favorizează biosinteza 17-dezoxicorticoizilor, NADH stimulează producerea 17-hidroxicorticoizilor şi inhibă conversia pregnenolonei în progesteronă; în scorbut, raportul NAD^+/NADH este semnificativ scăzut atît în c.s.r. cît şi în ovare şi se instalează degenerarea foliculilor şi atrofia corpilor galbeni, cu consecinţele inerente asupra ciclului şi respectiv cu producerea sterilităţii. Vitamina C participă, de asemenea, direct în biosinteza adrenalinei şi stimulează secreţia ACTH (din hipofiză) şi a insulinei (din celulele β-pancreatice), dar are un efect de scădere a funcţiilor tiroidiene *(H. Staudinger, K. Kirsch, S. Leonhaüser, 1961; A. E. Kitbachi, 1967; M. Devine, I. M. Rivers, 1969; L. Ababei, M. Trandafirescu, 1974)*.

Rol în formarea şi menţionarea integrităţii matricei intercelulare. Celulele din ţesuturi sînt incluse într-o substanţă fundamentală vîscoasă, care izolează celulele de mediul ambiant şi prin care trebuie să traverseze moleculele care intră în celulă sau o părăsesc. În consecinţă, natura fizico-chimică a mediului extracelular (polimerizare — depolimerizare) exercită o puternică influenţă asupra celulelor vii şi, la rîndul lor, acestea pot modifica microambianţa lor imediată. Vîscozitatea substanţei fundamentale — matricea intercelulară — se datoreşte unor polimeri înalt moleculari: polimeri de mucopolizaharide cu lanţ lung, glicosaminoglicani şi proteoglicani, care se constituie la nivel microscopic într-o reţea tridimensională de fibre de colagen care reprezintă un adevărat „mediu intern" *(Cl. Bernard)*. Elementele constitutive ale acestor polimeri sînt acidul hialuronic, condroitina, condoitinsulfaţii *(cap. 1.1.4.6)*. Depolimerizarea matricei presupune o acţiune secvenţială care implică enzimele lizozomale: glucozidaze (hialuronidaza), proteaze, colagenaze etc., care sînt, în mare măsură controlate de vitamina C *(E. Cameron, L. Pauling, B. Leibovitz, 1979)*.

Observaţiile mai vechi, care semnalau în carenţa vitaminei C scăderea formării colagenului, au fost confirmate cu ajutorul ^{14}C-hidroxiprolinei, care a relevat că animalele scorbutice pot utiliza hidroxiprolina (într-o oarecare măsură) în biosinteza colagenului, dar că se înregistrează un deficit în etapa transformării prolinei în hidroxiprolină, proces vitamin C-dependent. Această hidroxilare are loc după încorporarea Pro (sau Liz) într-o peptidă denumită „protocolagen", care, prin hidroxilarea Pro (Liz) cu ajutorul protocolagen-prolinoxidazei (enzimă izolată din ţesuturile embrionare şi ale şobolanului şi cobaiului adult) se transformă în colagen *(N. Robertson, 1961; R. Hutton, S. Udenfried şi colab., 1966, 1967)*.

Pe de altă parte, vitamina C este necesară sintezei mucopolizaharidelor *in vivo, in vitro* şi în culturi de fibroblaşti. Colagenul animalelor scorbutice conţine cantităţi mult mai mici de condroitinsulfaţi; ritmul de încorporare a S marcat în mucopolizaharidele ţesutului colagen este redus la 1/3 faţă de normal, deficit explicat prin scăderea concentraţiei de condroitină, acceptor al sulfatului şi prin scăderea cantităţii de galactozamină, datorită inhibării ADP-N-acetilglucosamin-4-epimerazei. Ţesuturile de cicatrizare ale cobaiului scorbutic sînt anormale, conţinînd concentraţii de 5 ori mai mari de mucopolizaharide, în special

de tipul hialuronidaţilor, ceea ce sugerează scăderea capacităţii de depolimerizare a acidului hialuronic *(E. Kodicecк, 1958, 1968; S. Udenfriend, R. Hutton, 1966—1967; J. R. Schafer, J. C. Sullivan, L. Silverman, N. Robertson şi colab., 1966—1967)*.

Vitamina C joacă un rol important şi în calcefierea dinţilor (în special la nivelul osteoclastelor); în creşterea tonusului muşchilor netezi şi scăderea contractibilităţii celor striaţi; în creşterea rezistenţei organismului la oboseală, frig, infecţii, intoxicaţii, cancerizare etc. şi s-a emis ipoteza că acidul dehidroascorbic joacă un rol esenţial în creşterea şi diviziunea normală a celulelor *(J. A. Edgar, 1969, 1970)*.

Între acţiunile vitaminei C la nivel molecular se relevă: controlul integrităţii ţesutului conjunctiv prin mecanisme variate: conversia Pro la Hipro şi respectiv în formarea moleculei colagenului; în sinteza galactozaminei şi în încorporarea sulfaţilor în mucopolizaharide; în controlul depolimerizării acidului hialuronic, care „se pare că reprezintă cheia proprietăţilor sale antiscorbutice" *(J. A. Schilling, 1968)*.

Rolul vitaminei C în rezistenţa la infecţii. Numeroase observaţii relevă incidenţa mare a complicaţiilor infecţioase în scorbutul uman şi experimental şi faptul că vitamina C scade *in vivo* şi *in vitro* agresivitatea diferitelor toxine (difterice, tetanice, stafilococice etc.). Constatarea că speciile incapabile să sintetizeze vitamina C sînt cele mai sensibile la infecţiile cu *Mycobacterium tuberculosis*, scăderea nivelului acidului ascorbic din sînge şi din depozitele leucocitare şi tisulare la persoanele cu tuberculoză evolutivă, viroze respiratorii, afecţiuni gripale, *a frigore*, şi în alte stări infecţioase, toxice şi în leziunile cutanate face ca efectul protector al vitaminei C în asemenea condiţii să fie unanim recunoscut.

Rolul vitaminei C în fagocitoză este ilustrat atît prin conţinutul ridicat al leucocitelor în acid ascorbic (25—35 mg% faţă de 0,6—1,2 mg % în plasmă), prin indicele fagocitar (reacţia leucocitelor opsonofagocitare, cu implicarea lizozomilor, mult superioară la animalele cu aport crescut de vitamină C faţă de cele carenţate), cît şi prin gradul de activitate fagocitară a leucocitelor umane (de exemplu, faţă de stafilococul auriu). Participarea vitaminei C în apărarea umorală şi respectiv în anticorpogeneză rezultă dintr-o serie de observaţii ca: titrul scăzut al complementului, în paralel cu deficitul în vitamină C la animalele carenţate şi cu nivelul ascorbemiei la om (iarna cînd aportul de vitamină C este scăzut). Cercetările clinice şi experimentale concordă în a ilustra efectul favorabil al vitaminei C în prevenirea infecţiilor, în formarea anticorpilor după infecţii şi, în general, în reacţiile imunitare, atît la animalele tributare aportului exogen de vitamină C, cît şi la cele care o pot sintetiza *(după I. Gonţea, 1968, 1971)*.

Rolul vitaminei C în stările de „răceală" („common cold"; viroze respiratorii; guturai). Informaţiile din ultimii 20 de ani relevă particularităţile de metabolizare ale acidului ascorbic în „răceli" şi mecanismele implicate în procesele de „desaturare" a organismului în vitamină C. În primele 3 zile ale „răcelii" banale, la bărbaţi şi femei, se înregistrează scăderea rezervelor de vitamină C din leucocite, care trec în plasmă, pe măsură ce infecţia virală evoluează. Nivelele plasmatice scad şi ele (în special la bărbaţi), deoarece vitamina C trece, în faza toxică a infecţiei, în ţesuturi, pentru a asigura aprovizionarea celulelor şi, în mod special, în ţesuturile respiratorii inflamate în cursul fazei catarale (în această fază este crescut şi fluxul depozitelor labile leucocitare în plasmă). Testul de încărcare (cu 500 mg vitamină C), în primele 3 zile ale „răcelii", arată creşterea nivelului plasmatic al vitaminei C, dar cu diferenţe faţă de persoanele sănătoase, în sensul că în această situaţie nu se observă creşterea rezervelor din leucocite şi a eliminării urinare, dovadă a unui consum crescut. Este de reţinut condiţionarea determinată de caracteristicile metabolice legate de sex. Administrarea unei doze de 2.000 mg vitamină C ameliorează simptomele din stările acute de răceală şi creşte semnificativ conţinutul de vitamină C din leucocite la femei, în timp ce la bărbaţi creşterea este neîn-

semnată; la 3 săptămîni după dispariţia simptomelor „răcelii", administrarea unei doze de 500 mg vitamină C arată o trecere din plasmă în leucocite (depozitare) mult mai intensă la femei, ceea ce ilustrează „normalizarea" rezervelor consumate în timpul „răcelii"; la bărbaţi trecerea este mult mai scăzută şi indică persistenţa stării de „desaturare" în vitamină C.

În cursul „răcelii" se înregistrează o serie de semne ale carenţei vitaminei C, ca: „desaturarea" în vitamina C a ţesutului pulmonar cu scăderea funcţiilor pulmonare; simptomele de origine alergică ale căilor respiratorii superioare din carenţa C par similare cu cele din cursul „răcelii"; preluarea de către leucocite a acidului ascorbic este scăzută în alergia atipică; alterări ale leucocitelor asociate cu reacţiile „antigen-anticorp", considerîndu-se că deficitul în acid ascorbic reduce reactivitatea imunologică şi producţia de anticorpi în cursul atacului viral. Pe de altă parte, concentraţia adecvată de vitamină C din leucocite este esenţială pentru fagocitoză, unul din cele mai importante mecanisme de apărare a organismului faţă de infecţii; în cursul „răcelii" şi alergiei atipice se constată distrugerea membranelor mucoaselor respiratorii, cu scăderea formării şi dezvoltării membranei bazale epiteliale şi de aceea administrarea vitaminei C, asigurînd integritatea şi îngroşarea membranelor mucoaselor, previne pătrunderea şi răspîndirea rhinovirusurilor; în ultimele faze apar, adesea, hemoragii nazale, dureri ale încheieturilor şi muşchilor în timpul stadiului toxic sau acut al reacţiei alergice; dispnee, depresiuni, semne ale scorbutului ce pot fi atribuite „desaturării" acute, relative, a ţesurilor în acid ascorbic, cauzate de expunerea la atacul viral şi la reacţia imunologică. Pe baza celor menţionate se recomandă administrarea, preventivă sau curativă, a unor doze terapeutice de vitamină C, 500 mg la femei şi 1.000—2.000 mg la bărbaţi, care manifestă efecte de creştere a rezistenţei şi respectiv de ameliorare a „răcelii" şi care nu par însoţite de producerea unor reacţii secundare — adverse nedorite *(E. Collingham, C. A. Mills, 1943; Y. Ericsson, H. Lundbeck, 1955; F. R. Cate şi colab., 1964; J. S. Stewart, 1968; C. W. M. Wilson, H. S. Loh, 1969, 1973, 1974; L. Pauling, 1970; R. Hume, E. Weyers, 1973; T. W. Anderson, 1973.*

Vitamina C şi cancerul. O serie de cercetări experimentale şi clinice relevă agravarea proceselor canceroase în carenţa vitaminei C şi respectiv efectele favorabile ale acestei vitamine în prevenirea şi terapia cancerului, prin mecanisme diferite;

Implicarea vitaminei C în rezistenţa la neoplazii, argumentată prin trecerea masivă a vitaminei C în celulele canceroase, care o reţin selectiv, la concentraţii mult mai ridicate, faţă de ţesuturile normale şi o utilizare mai intensă, ceea ce duce la depletiţia („desaturarea") rezervelor tisulare şi circulante, ilustrate şi prin testele de încărcare cu vitamină C.

Procesele tumorale se caracterizează prin depolimerizarea matricei adiacente, din imediata vecinătate a celulelor neoplazice, datorită eliberării enzimelor lizozomiale cu efecte catabolice: glucozidaze (hialuronidaza), proteaze neutre, colagenaze, nucleaze, sulfataze, fosfataze. Ca rezultat al acţiunii acestor enzime se produce scăderea adezivităţii celulelor şi alterarea barierei membranelor celulare, cu favorizarea proceselor invazive. S-a ajuns astfel la părerea că singura *diferenţă esenţială între proliferarea celulelor „neoplazice" şi „normale" este persistenţa eliberării hialuronidazei*, în primul caz *(E. Cameron, L. Pauling, 1973)*. Între mecanismele biochimice care controlează aceste procese se poate menţiona că produşii finali ai degradării glicosaminglicanilor, (glucozamina), exercită un efect *feed-back* negativ, inhibitor, asupra activităţii hialuronidazei şi asupra enzimelor implicate în biosinteza ADN, ARN şi proteinelor; la fel, resturile de condroitinsulfaţi şi alte polizaharide polisulfatatate (inclusiv heparina) şi vitamina P au efecte de inhibare a hialuronidazei şi de stabilizare a lizozomilor. În plus, se acordă o atenţie deosebită unei fracţiuni glicoproteice specifice, denumită „PHI" (inhibitor fiziologic al hialuronidazei) prezentă în serul tuturor speciilor şi care creşte în infecţii, în cursul vindecării rănilor, în artrita reumatică şi în cancere. *Acest factor, care explică efectul inhibitor al serului bolnavilor canceroşi asupra hialuronidazei in vitro ar avea drept componentă activă* o **tetrazaharidă** *în care unitatea terminală de acid glucuronic este înlocuită cu acid ascorbic* şi care fiind rezistentă la acţiunea exoglucozidazelor ar bloca întregul proces al depolimerizării glucosaminoglicanilor. Ipoteza că acidul ascorbic este necesar pentru biosinteza şi structurarea PHI oferă explicaţii biochimice cu privire la participarea vitaminei C în prevenirea scorbutului (asociat cu depolimerizarea generalizată a matricei, cauzată de expunerea la hialuronidaza neinhibată); în vindecarea rănilor (prin favorizarea procesului de dediferenţiere a celulelor) şi în limitarea (naturală) a acţiunii enzimelor de depolimerizare ale matricei intercelulare şi deci în menţinerea integrităţii acesteia, care funcţionează ca o primă barieră de apărare faţă de creşterea invazivă. Această apărare este puternic întărită de o nouă barieră, reţeaua de colagen, cu „încapsularea" tumorilor printr-un ţesut fibros nou, pe care celulele cu creştere invazivă caută să-l dizolve cu ajutorul colagenazelor eliberate din lizozomii celulelor neoplazice. Efectul protector al vitaminei C este ilustrat atît prin participarea sa în biosinteza colagenului, constituind un cofactor necesar în hidroxilarea prolinei şi lizinei, cît şi prin inhibarea proceselor catabolice; în acest sens pledează observaţia că eliminarea „UHP" (hidroxi-prolina urinară), indicator fidel al catabolismului colagenului, crescut în paralel cu avansarea bolii canceroase şi cu scăderea rezervelor de acid ascorbic din leucocite, scade (se normalizează) prin administrarea unei doze de 1 g vitamină C *(E. Cameron, L. Pauling, B. Leibovitz, 1979)*.

Scanned with OKEN Scanner

Rolul vitaminei C în sistemul de apărare imunologică (rezistența la cancer) rezultă atît din participarea sa în stimularea sistemului reticulo-histiocitor și respectiv în biosinteza imunoglobulinelor (corelația pozitivă între nivelul ascorbatului plasmatic și titrul IgG și IgM), cît și prin intermediul leucocitelor, saturarea lor cu ascorbat fiind asociată cu imunocompetența crescută; de asemenea, vitamina C este implicată în fagocitoza activă *in vivo* și *in vitro* și în creșterea producției de interferon *(O.M. Robertson, D.C. Williams, 1969; E. Cameron, L. Pauling, 1976—1979; H. Dahl, M. Degré, 1976; R. Ganguly, M.F. Duriez, R. H. Wildman, 1976)*.

O alterare biochimică fundamentală în cancerizare și transformarea virală a celulelor este *scăderea respirației oxidative*, cuplată cu creșterea glicolizei anaerobe și deci a producerii de lactat, pe fondul creșterii activității tuturor enzimelor glicolitice; de exemplu, în ficatul animalelor expuse la agentul cancerigen 3'-metil-dimetil-aminoazobenzen, activitatea glucochinazei este crescută cu 570%. Adăugarea acidului ascorbic are un efect de creștere a consumului de oxigen, cu scăderea producției de lactat, producînd, de exemplu, o inhibiție de 72% a glicolizei anaerbe în celulele ascitice ale tumorii Walker *(O. Warburg, 1956; O. Bodansky, 1975; G. Weber, 1977)*.

Sistemul tampon redox „acid ascorbic/acid dehidroascorbic" joacă un rol important în asigurarea mediului favorabil metabolizării normale a glucidelor (alterat în cancer), cu implicarea ciclului citric, a lanțului transportor de e^-, dar, în același timp, acidul dehidroascorbic și unii metaboliți ai vitaminei C, cum este 5-metil-3,4-dihidroxitetrona, manifestă efecte anticancerigene, prin interacțiunea cu ADN și respectiv prin prevenirea degradării acestuia la acidul deoxicitidilic și la nucleotidele pirimidinice, procese observate în procesul cancerizării *(A. Nason și colab., 1954; H. Omura și colab., 1971—1975)*.

Vitamina C, *ca o componentă a „oxidazelor cu funcțiuni mixte microzomiale"* („OFMM") implicate în biotransformarea compușilor xenobiotici (străini) *joacă un rol important în protejarea organismelor față de acțiunea compușilor cancerigeni*, prin intensificarea gradului lor de metabolizare, cu formarea unor compuși hidrosolubili, mai ușor de eliminat. Asemenea efecte s-au înregistrat pentru o vastă serie de agenți cancerigeni: benzo(a)piren, 7,12-dimetilbenzantracen, N-2-fluorenil-acetamidă, 4-dimetilaminostilben, aflatoxine, coloranți aminozoici, 3-metil-4-dimetilaminoazobenzen, 2-acetilaminofluoren; în limitarea formării nitrozaminelor, produși ai reacțiilor nitriților cu grupările aminosecundare, alchil-uree sau N-alchil-carbamați, compuși puternic implicați în cancerogenză; în protejarea față de efectul compușilor cancerigeni din fumul de țigară (fumătorii au un nivel scăzut al acidului ascorbic în plasmă și în depozite) și față de agenții cancerigeni din mediul industrial care produc cancere ale vezicii, ca de exemplu, 4-aminofenilul, benzidina, 2-naftilamină, precum și față de aminele N- și o-hidroxi-aromatice, între care se înscriu și unii metaboliți ai triptofanului (kinurenină, acid xanturenic), care cresc, în special, în unele leziuni biochimice ale metabolismului triptofanului. Efectele cancerigene ale radiațiilor actinice U.V. nonionizante, care duc la formarea colesterol-5α, 6α-epoxidului, incriminat în cancerele pielii, sînt diminuate prin alimentarea animalelor cu o serie de antioxidanți, inclusiv cu acid ascorbic *(C. Goyanna, 1955; A. Alifano, S. Papa, F. Tancredi., M.A. Elico, E. Quagliariello, 1964; O. Pelletier, 1970, 1975, 1977; S.S. Mirvish și colab., 1971, 1975; H.S. Black, J.T. Cahn, 1971—1977; L.W. Wattemberg, 1972; W. Lijnsky, S.S. Epstein, 1976; O.S. Hoefel, 1977; E. Cameron, L. Pauling, B. Leibovitz, 1979; D. Bedeleanu, M. Kory, 1976)*.

Observația că acidul ascorbic în doze mari *manifestă efecte citostatice* asupra celulelor canceroase a condus la recomandarea tratamentului *„ortomolecular"* al cancerelor umane. Medicina *„ortomoleculară"* urmărește asigurarea sănătății și tratamentul bolilor prin modificarea concentrației substanțelor care sînt normal prezente în corp și necesare sănătății *(L. Pauling, 1967, 1968, 1970)*. În acest sens, se consideră că administrarea unor cantități excesive de vitamină C (10 g/zi în infuzii i.v., timp de 10 zile și în continuare, în aceeași doză, *per os*) creează un mediu biochimic favorabil pentru țesuturile normale dar nefavorabil pentru cele neoplazice și crește astfel la maxim rezistența naturală față de procesul cancerizării, atît preventiv cît și terapeutic *(E. Cameron, L. Pauling, 1970—1979)*. Se apreciază, de către adepții acestei terapii, că raportul beneficiu/risc, față de gravitatea bolii și a altor mijloace de tratament este net în favoarea vitaminei C, chiar în condițiile posibilității apariției unor reacții secundare-adverse la dozele excesive de vitamină C administrate *(T. W. Anderson, 1977)*.

2.1.17.6. *HIPO- ȘI AVITAMINOZA C. NECESITĂȚI*

2.1.17.6.1. NECESITĂȚI ÎN VITAMINA C

Necesitățile în vitamină C trebuie apreciate în raport de specie și condiții. Majoritatea speciilor animale pot realiza sinteza vitaminei C în cantități suficiente și în această situație ea funcționează mai mult ca un „hormon" și este mai corectă folosirea noțiunii de „cantitate utilă".

Scanned with OKEN Scanner

Omul, lipsit de capacitatea de biosinteză şi cu depozite reduse de vitamină C (aproximativ 1,5 g) este tributar aportului exogen, de preferat zilnic, dar părerile asupra necesităţilor diferă. Unii consideră că 1,5—10 mg vitamină C/zi ar fi suficiente pentru prevenirea accidentelor grave de scorbut, dar asemenea recomandări sînt „negative" deoarece se referă numai la prevenirea deficitului (scorbut); recomandările „pozitive" ţin seama de aportul cantităţilor care să asigure eficienţa optimă în funcţiile metabolice şi a integrităţii ţesuturilor, şi, implicit, în evitarea stărilor de precarenţă. Aceste necesităţi se cifrează la 50—70 ml/zi, respectiv 1 mg/kg greut. corp./zi (S.U.A., Anglia) şi chiar de 125 mg/zi (URSS); se apreciază că 1,4—1,8 mg/kg greut. corp. produc „saturarea" şi pierderea excesului prin urină şi că dozele mari, de 1.000 mg/zi (preconizate de *L. Pauling, 1970*), argumentate prin exotrapolarea datelor de la animalele care sintetizează vitamina C la om, nu par justificate şi ar putea cauza unele efecte nedorite *(J. R. Evans; R. E. Hughes; R. S. Williams; C. M. Wilson; 1972, 1974)*.

Aportul şi necesităţile reale sînt condiţionate de o serie de factori:

Conţinutul din alimente. Alimentaţia din timpul iernii şi primăverii aduce o cantitate mai mică de vitamina C, prin lipsa produselor vegetale proaspete şi prin pierderile prin conservare (păstrarea cartofilor din septembrie pînă în decembrie relevă pierderi de 50% şi pînă în aprilie de 80%), ceea ce poate duce la hipovitaminoza C („oboseala de primăvara"). Prelucrarea alimentelor determină, de asemenea, pierderi importante de vitamină C (prin fierbere sau tratare cu vapori se distruge 30—40 %din vitamină; prin încălzire rapidă la 60—80 °C pierderile sînt mai mici). La lipsa reală din alimente se adaugă, drept cauze ale carenţelor, tulburările de absorbţie: afecţiuni gastrointestinale aclorhidrie (cancere), ulcere peptice, malabsorbţii, enterocolite (distrugeri prin colibaccili) etc.

Diferenţe interindividuale şi determinate de bioritmuri. Unele persoane nu manifestă semnele carenţei la un aport prelungit de numai 10 mg vitamină C/zi, în timp ce altele necesită 200 mg/zi, ceea ce relevă mari variaţii interindividuale condiţionate, probabil, de „individualitatea: biochimico-metabolică" a acestora.

Concentraţiile din leucocite şi plasmă manifestă, simultan, *ritmuri circadiene, lunare* şi *circanuale*, cu valori maxime în martie şi iulie şi minime în octombrie, ceea ce sugerează că nivelele acidului ascorbic, şi deci necesităţile omului, sînt supuse unor ritmuri metabolice intrinsece (endogene), independente de aportul alimentar (*H.S. Loh; C.W.M. Wilson, 1971, 1973, 1974*).

Diferenţe de vîrstă şi sex. Se constată o corelaţie de proporţionalitate inversă între vîrstă şi concentraţia vitaminei C din leucocite şi plasmă. Astfel, de exemplu, după o doză de 500 mg vitamină C se înregistrează, la vîrsta de 4—12 ani, concentraţii de 56,4±21,9 $\mu g/10^8$ leucocite; între 12—18 ani: 36,6±9,1 la băieţi şi 42,8±12,6 la fete; între 22—49 ani: 30,4±8,7 la B şi 34,0±±10,9 la F şi între 56—87 ani: 24,4±13,6 la B şi 23,4±11,3 la F *(H.S. Loh; C.W.M. Wilson, 1971, 1974)*.

Transferul acidului ascorbic din leucocite în plasmă este mai mare în perioada adolescenţei; la vîrsta înaintată (bătrîni) depozitele leucocitare şi nivelele plasmatice scad puternic, necesităţile metabolice pentru acidul ascorbic fiind în acest caz mai reduse. Este de menţionat că deşi femeile au un aport mai scăzut de vitamină C decît bărbaţii, totuşi ele au un nivel leucocitar şi plasmatic mai ridicat de vitamină C. Această situaţie sugerează diferenţe legate de funcţiile sexuale în utilizarea vitaminei C şi care explică faptul că variaţiile între cele două sexe sînt mai pregnante în adolescenţă, cu o stabilizare între aportul alimentar, *turn-over-ul* metabolic şi nivelul de depozitare la adulţi şi dispariţia diferenţelor la persoanele în vîrstă. Se poate astfel reţine observaţia că femeile sînt mai adaptate pentru condiţiile care ar putea duce la carenţa în vitamină C şi că manifestă o „reajustare" a utilizării ei în timpul deficitului sau stresurilor, de aceea frecvenţa semnelor carenţiale este mai rară la femei; *(A. Brown, 1951; W.B. Bartley, H.A. Krebs, J.R.P.O'Brier, 1953; A.F. Morgan, 1955; H.S. Loh; C.W.M. Wilson; J.M. Woodhill şi colab., 1970—1974)*.

Se apreciază că necesităţile *sugarului* sînt de 30—50 mg/zi şi ale *copilului de 1 an* de 30 mg/zi, ceea ce indică, prin raportare la greut. corp., necesităţi de 5—10 ori mai mari decît ale adultului. Datorită acestei particularităţi se impune o atenţie specială la imaturi şi la sugarii hrăniţi cu alimente prelucrate (sugarul hrănit exclusiv cu lapte fiert sau pasteurizat şi cu alimente fierte, deci lipsit de alimente proaspete) şi, în general, la copiii mai mari, cu atît mai mult cu cît în această perioadă sînt mai frecvente bolile contactoinfecţioase (febrile) care cresc mult cerinţele în vitamină C.

Necesităţi crescute se înregistrează la *gravide*: 75—100 mg/zi (sîngele fetusului conţine concentraţii mult mai mari de vitamină C decît cel matern şi consumă cantităţi mai mari, datorită procese-

lor metabolice foarte intense); în *alăptare*: 125 mg/zi (laptele matern conține 20—70 mg vitamină C/litru); la femeile care utilizează anticoncepționale orale; în stresuri prin frig, în arsuri extinse, traume, plăgi, intervenții chirurgicale; în ambianța cu temperaturi ridicate; în bolile febrile: răceli, gripă, pneumonie, în tuberculoză (250 mg/zi); în timpul terapiei cu numeroase medicamente (de exemplu chiar aspirina blochează preluarea vitaminei C de către leucocite și plăcuțe și de aceea apar necesități crescute la pacienții care iau regulat aspirina și compuși înrudiți în tratamentul cronic al reumatismului articular); în intoxicații și în condițiile agresiunii cu agenți poluanți și/sau cancerigeni, inclusiv la fumători (care au nivele scăzute de vitamină C); în anemiile hipocrome; în endocrinopatii; în diferite avitaminoze (rahitism, pelagră) etc.

Utilitatea unui aport crescut de vitamină C *în prevenirea aterosclerozei* rezultă din observarea unui nivel scăzut al vitaminei C în condițiile existenței unor factori de risc la ateroscleroză, de exemplu, la fumători; persoanele în vîrstă, cu risc crescut la bolile coronariene-trombotice au un nivel scăzut al vitaminei C, considerîndu-se că ei prezintă cel puțin unul din semnele caracteristice ale deficitului în vitamină C. În plus, administrarea vitaminei C (1 g/zi) scade în 6 luni nivelul colesterolului (factor de risc) cu 17% la persoanele de peste 50 de ani; ca mecanism biochimic, se relevă creșterea de 3 ori a transformării colesterolului în acizi biliari, sub efectul dozelor mari de vitamină C, prin creșterea activității enzimelor „OFMM", de hidroxilare a colesterolului, implicate și în biotransformarea compușilor străini *(J.C. Brocklehurst și colab., 1968; C.W.M. Wilson, 1974; J.C. Street, M.J. Schneider, 1975; D. Bedeleanu, M. Kory, 1976)*.

2.1.17.6.2. CARENȚA VITAMINEI C LA ANIMALE

Avitaminoza C, scorbutul, este un sindrom de dezintegrare generalizată la toate nivelele, implicînd dizolvarea substanței fundamentale intercelulară, scăderea sintezei colagenului și intensificarea ruperii lanțurilor de colagen, liza „cimentului" interepitelial și interendotelial, conducînd la ulcerații cu dezvoltarea secundară a coloniilor microbiene și la dezagregări vasculare cu edeme și hemoragii interstițiale și la un fenomen, căruia i s-a acordat mai puțină atenție: proliferarea generalizată a celulelor nediferențiate, cu o „întoarcere" de la organizarea multicelulară la o stare primitivă unicelulară (similară cancerizării). Corectarea acestor anomalii prin administrarea vitaminei C relevă importanța sa pentru prevenirea și terapia scorbutului, dar și a altor condiții patologice care manifestă asemenea alterări *(C.W. Woodruff, 1964; E. Cameron, L. Pauling, L.P. Leibovitz, 1979)*.

La *cobai*, lipsa totală a vitaminei C din alimentație duce la moartea rapidă, de aceea se realizează doar o carență parțială cînd se observă tumefacții caracteristice, hemoragii articulare și periarticulare, dureri și poziții caracteristice; animalul se mișcă greu și manifestă paralizii, decalcefieri, fracturi spontane, osteoporoză. Primele leziuni apar rapid; după cinci zile de carență se observă alterarea dinților și a substanței fundamentale; la zece zile de carență, animalul se agită, prezintă dureri la atingere, dinții cad și apar hemoragii și, în continuare, survine moartea.

S-a sugerat că acțiunea vitaminei C asupra creșterii cobaiului se exercită primar printr-un efect metabolic asupra formării țesuturilor; „desaturarea" în acid ascorbic a țesuturilor se asociază cu scăderea azotului, interferențe cu metabolismul colesterolului și trigliceridelor și cu inhibarea acțiunii insulinei asupra captării glucozei în celule.

Carențe spontane pot apare, mai ales primăvara cînd alimentația este deficitară în vitamină C, și la animalele capabile să sintetizeze vitamina C, la viței, capre, oi, porci etc., în special sub forma atrofiei ciroase a mușchilor (degenerare hialino-ciroasă a fibrei musculare), dureri musculare etc.

În cadrul carențelor prin *antivitamine C*, șoarecele supus unui regim alimentar purificat și în care s-a înlocuit acidul ascorbic cu o antivitamină C, de exemplu cu *acidul glucoascorbic*, manifestă tulburări similare cu cele ale omului sau cobaiului: hemoragii articulare și cutanate, edeme ale gleznelor, decalcefieri, diaree etc. Faptul că administrarea simultană a vitaminei C nu ameliorează, în totalitate, aceste simptome indică mai mult posibilitatea unei acțiuni toxice decît un antagonism competitiv al antivitaminei față de acidul ascorbic *(W. Schafer, 1950)*.

2.1.17.6.3. HIPO- ȘI AVITAMINOZELE C UMANE

Manifestările carenței umane sînt determinate de „desaturarea" în vitamină C a leucocitelor și țesuturilor și de necesitățile ridicate ale unor țesuturi particulare . Ele apar sub formă diferită, în dependență de vîrstă, gradul de carențare: uneori ușoare și pasagere (de exemplu, în legătură cu anotimpurile,

Scanned with OKEN Scanner

sau mai grave: stările de scorbut, aşa cum au fost descrise în trecut (la soldaţii romani, navigatori, cruciaţi) şi care în prezent sînt aproape necunoscute. În schimb formele de precarenţă şi hipovitaminoză sînt foarte răspîndite, în special la copii, primăvara.

Avitaminoza experimentală pe voluntari supuşi unui regim lipsit de vitamină C timp de 26—180 zile se manifestă diferit de hipo- sau avitaminozele naturale. În primele săptămîni, se înregistrează scăderea nivelului vitaminei C din sînge şi din leucocite (pînă la dispariţie), obişnuit fără manifestări clinice caracteristice şi care răspunde favorabil la administrarea a 1 g vitamină C/zi. În continuare (2—6 luni de carenţă) apar semnele „clasice" şi anume: — *alterări capilare şi vasculare:* limbă cu leziuni peteşiale, peteşii hemoragice, hemoragii gingivale, conjunctivale, nazale; echimoze, hematoame; hematurie; — *afecţiuni dermice:* friabilitatea şi căderea părului, foliculi piloşi congestivi, acnee, hiperkeratoză, sclerodermie, piele solzoasă, prurit; pigmentare (brună sau purpurie); sindromul Sjoegren, insuficienţa tuturor glandelor exocrine, cu keratoconjunctivită uscată, uscăciunea cavităţilor bucale, nazale, faringiene, salivaţie scăzută, carii dentare, hipoaciditate gastrică, insuficienţă pancreatică, piele uscată, scuamoasă, depigmentaţie, eczemă şi cu alterări biochimice: disproteinemie, hipersideremie, anemie hipocromă, fibrinogen crescut; afectează mai frecvent femeile în perioada de preclimacteriu iar dacă survine la o vîrstă mai tînără se observă hipofuncţie ovariană *(H.S.G. Sjoegren, 1933; după M. Feighin, 1967);* — *alterări ale ligamentelor, oaselor şi muşchilor;* artralgie, sensibilitatea şi durerea membrelor; demineralizări ale scheletului; carii; — *alterări respiratorii:* dispnee, sensibilitatea mucoasei bucale, predispoziţie crescută la răceală, gripă, amigdalită; — *afecţiuni ale nervilor periferici* (neuropatie femurală, ulceraţii ale pielii, şi ale sistemului nervos central: oboseală fizică şi intelectuală, letargie, depresii, hipocondrie, histerie, anxietate; — *alterări metabolice generale:* apetitul nu este afectat, totuşi, apar pierderi în greutate şi edeme *(W.H.Bartley, H.A. Krebs, J.R.P. O'Brien, 1953; C.W.M. Wilson, 1974).*

Avitaminoza sugarului *(boala Möller-Barlow)* apare ca o formă a scorbutului la sugarul hrănit cu lapte de vacă fiert sau pasteurizat. Formele grave se caracterizează prin leziuni osoase, cu torace deformat (similar rahitismului), tulburări circulatorii, dureri mari la mişcare sau presarea muşchilor; hemoragii meningeale şi la nivelul ochilor, exoftalmie; infecţii şi dermatite. Moartea survine prin infecţii asociate sau colaps cardiac acut. Dacă această formă gravă este în prezent aproape inexistentă, în schimb formele mai uşoare sînt frecvente la copiii subalimentaţi sau hrăniţi artificial, cu alimente fierte.

Hipovitaminoza copilului. Considerînd necesităţile, proporţional, mai mari ale copilului faţă de adult *(cap. 2.1.17.6.1)*, stările de hipovitaminoză C sînt mai frecvente la copii şi se manifestă prin încetarea creşterii, subfebrilitate, anemie hipocromă, edeme, tulburări digestive (diaree), anorexie, adinamie, leziuni osoase (tendinţă la fracturi, carii dentare), dureri la încheieturi, hematoame (subperiostale), hemoragii, gingivite. Formele mai uşoare — foarte importante prin răspîndirea lor extinsă- se manifestă cu tulburări mai atenuate: paliditate, oboseala, anemie, cianoză (urechi, nas, buze, unghii), tendinţa la hemoragii la presare (elasticul de la ciorapi, cureaua de la ceas etc.), hemoragii gingivale, pioree alveolară, paradontoză, dureri la mers. Acestor simptome trebuie să li se acorde o atenţie specială, ele fiind uşor prevenite sau vindecate, printr-un regim alimentar adecvat şi/sau suplimentare cu vitamină C (preparate farmaceutice, sucuri naturale etc.).

Carenţa adultului. *Distrofia scorbutică* sau *carenţa latentă* ilustrează o stare de precarenţă sau postcarenţă (vindecare insuficientă), cu următoarele manifestări generale: inapetenţă, iritabilitate, apatie, astenie („de primăvara"), dureri de tip reumatismal (oase, articulaţii), anemie hipocromă (care nu răspunde la fier), piele uscată, rugoasă; hemoragii şi respectiv echimoze (hemoragii cutanomusculare pe gambe, la antebraţe, subperiostice). În literatura de specialitate se menţionează un „scorbut al burlacilor" datorit consumării alimentelor conservate *(Martin D. W. şi colab., 1983).*

Scanned with OKEN Scanner

În formele grave (scorbut) apar hematoame („moleți"), exsudate, hemoragii în cavitățile seroase: pleură, pericardice, în peritoneu și respectiv în lumenul intestinal (diaree sanguinolentă); hematurie (macro- și microscopică); alterări ale cavității bucale: gingii roșii-violete, hemoragice și cu ulcerații suprainfectate (gingivite dureroase), instabilitatea dinților (pînă la cădere). În formele avansate se observă deschiderea cicatricelor vechi (aparent vindecate), plăgi, gangrene, decalcefieri (cu tendință la fracturi), leziuni nervoase.

Tulburările se instalează progresiv; unele (care apar inițial) sînt reversibile și cedează la alimentația bogată în vitamină C și/sau la administrarea preparatelor de vitamină C; altele, mai grave (rare, instalate după o perioadă lungă de carență) sînt ireversibile și persistente, ducînd la complicații secundare: stări de carențe polivitaminice, scăderea rezistenței la stresuri, infecții, toxice etc.

O problemă de interes este a consecințelor *mijloacelor de slăbire („antiobezitate")* asupra vitaminei C din organism. Se știe că în instalarea scorbutului experimental se constată pierderi importante în greutate; efectul *Fenfluoraminei* („*Ponderax*", medicament „antiobezitate") se manifestă atît prin scăderea greutății corporale, cît și prin pierderi importante de acid ascorbic. Dietele moderne de reducere a greutății urmăresc controlul, în diferite grade, a utilizării lipidelor, glucidelor și proteinelor, dar nu acordă atenție nivelului vitaminei C din organism. Or, în asemenea cazuri, dacă nu se suplimentează regimul cu vitamină C se înregistrează accentuarea pierderilor de vitamină C (catalitice), cu apariția unei stări de „desaturare" a rezervelor circulante și tisulare de vitamină C *(J.H. Crandon, C.C. Lind, D. B. Dill. 1940; W.H. Bartley, H.A. Krebs, J.R.P. O'Brien, 1953; C.W.M. Wilson, 1974)*.

2.1.17.7. *FORME FARMACEUTICE. INDICAȚII. HIPERVITAMINOZA C*

Vitamina C este condiționată sub formă de fiole (200 sau 500 mg vit. C), comprimate (50 sau 200 mg acid ascorbic); comprimate efervescente (500 mg acid ascorbic); granule efervescente (Acidum ascorbicum: 5,00 g, Natr. bicarbonicum: 2,00 g, Sacharum: 88,45 g, Acidum citricum: 3,00 g, Aetheroleum aurantii: 1,00 g, Aetheroleum citri: 0,50 g, Colorant alimentar galben: 0,02 g și portocaliu: 0,03 g/100 g produs; se dizolvă 5 g (o linguriță) în 100 ml apă și se consumă ca o limonadă; pentru adulți: 2—4 linguriițe (0,5—1,0 g vitamină C/zi), pentru copii: 1—2 linguriițe (0,25—0,50 g vitamină C/zi); apare, de asemenea, în unele preparate de polivitamine.

Preparatele de vitamină C sînt indicate, specific, în stările carențiale (hipo- și avitaminoze C și asociate) și *ca adjuvant valoros* în afecțiunile cardiovasculare (boala hipertensivă, insuficiență cardiacă, sindroame hemoragipare prin afectarea permeabilității și rezistenței vaselor); în bolile aparatului respirator (viroze, pneumonii, pleurezii, astm bronșic, tuberculoză pulmonară); în anemiile feriprive (favorizează absorbția fierului), megaloblastice-macrocitare; în afecțiunile hepatice (hepatite, ciroze, inflamații ale căilor biliare); în tulburările digestive (boala ulceroasă, colita ulceroasă, diarei cronice, hemoragii gastrice și intestinale); în afecțiuni neurologice (edem cerebral, accidente hemoragice, encefalite, scleroza în plăci, coree); în boala reumatismală; în afecțiunile buco-dentare (gingivite, hemoragii gingivale și postextracții, paradontoze, carii, pioree alveolară); în afecțiunile otorinolaringologice (sinusite, flegmoane); în bolile infecto-contagioase și în general în bolile febrile; în stările pre- și postoperatorii și în convalescență; în bolile endocrino-metabolice (diabet, Addisson) etc.

Este de accentuat, în mod deosebit, utilitatea administrării vitaminei C la imaturi și respectiv la copii, în tulburările de creștere, astenie, dispepsii, în cursul bolilor infecto-contagioase, în convalescențe; în sterilitatea hormonală, în consumul anticoncepționalelor orale și la gravide (iminență de avort, vărsături); în perioada de alăptare; în stările de stres-șoc: arsuri, plăgi, în eforturi fizice (la muncitori, sportivi); în stările de astenie; în stările de răceală, respectiv viroze, gripă (eventual preventiv, în doze de 1 g/zi). Un domeniu important de utilizare a vitaminei C este în alergiile și intoleranțele la medicamente (sulfamide, aspirină, salicilați etc.) cu precizarea că vitamina C potențează acțiunile specifice a numeroase medicamente și că, în general, crește rezistența naturală a organismului la infecții, intoxicări, agenți poluanți, toxici, cancerigeni, medicamentoși și care justifică administrarea vitaminei C, chiar preventiv, mai ales în perioadele de carență sezonieră (iarna, primăvara).

O hipervitaminoză C, naturală, nu se cunoaște deoarece excesul (alimentar), după saturarea țesuturilor se elimină prin urină. La administrarea unor doze mari și repetate (peste 1 g/zi), nejustificate, pot apare insomnii, stări de excitație, dureri musculare, diaree și favorizarea formării calculilor, în special de oxalat *(R. W. Hellerman, 1958)*.

Scanned with OKEN Scanner

2.1.18. FLAVONOIDELE. BIOFLAVONOIDE. VITAMINA C_2. FACTORUL PERMEABILITĂȚII. VITAMINA P. CITRINA.

Observația că unele leziuni din scorbut, care nu răspund la acidul ascorbic sintetic, cedează la administrarea produselor naturale (suc de lămîie) au sugerat existența unui factor independent, dar care însoțește vitamina C, cu efecte favorabile asupra fragilității capilarelor și a permeabilității lor crescute. Această vitamină, „satelit" al vitaminei C a fost denumită *vitamina* C_2. *vitamina P* (permeabilității) sau *citrina* și reprezintă, în realitate, un amestec de compuși din clasa flavonelor *(Rusznyak, A. Szent-Györgyi, 1936)* pentru care s-a dovedit experimental efectul aupra permeabilității capilare *(Schille, 1951)*.

2.1.18.1. *STRUCTURA. RELAȚII „STRUCTURĂ-ACTIVITATE"*

În extractul de lămîie s-au identificat o serie de compuși care au la bază scheletul de *flavonă (fig. 2.88)*, un fenilcroman substituit (care are în comun cu vitamina E partea de cromanol). De la acesta derivă o serie de aproximativ 300 compuși identificați în produsele naturale, clasificați în grupe și subgrupe, ca de exemplu: catechine (tannoide), antociandioli, flavononene, flavone, flavonoli etc.

Compusul activ *„citrina"* este alcătuit din *eriodictiol* și combinația sa cu ramnoza, *eriodictina* și din *hesperidol* și derivatul său cu rutinoza (primii reprezintă aproximativ 25%, ultimii 75%). De asemenea, *epicatecolul* este unul din compușii cei mai activi, iar *rutina* (rutozid): 5,7,3′,4′-tetrahidroxiflavonol-3-β-rhamnoglucozidul se utilizează ca medicament *(fig. 2.88)*.

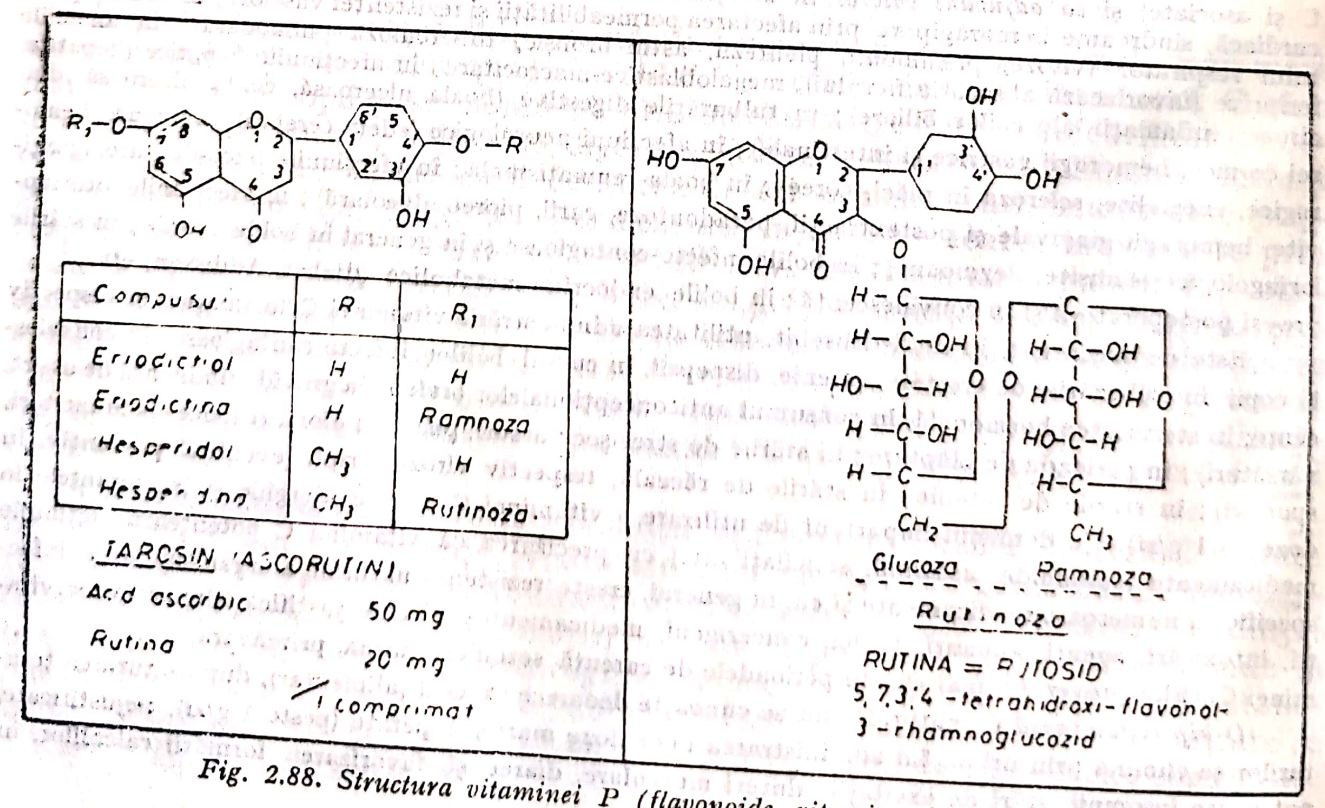


Fig. 2.88. Structura vitaminei P (flavonoide, vitamina C_2) și a rutinei

2.1.18.2. *PROPRIETĂȚI FIZICO-CHIMICE. METODE DE DOZARE*

Flavonolii și flavonele sînt pigmenți chimiotropi (galbeni) cu absorbție maximală la 320—380 și 240—270 nm și copigmenți ai antocianilor.

Eriodictiolul este solubil în apă; hesperidina, insolubilă.

Preparatul farmaceutic, *Rutosidum* (rutosid, rutina; F.R. IX) se prezintă ca o pulbere cristalină galbenă sau galben-verzuie, fără miros și fără gust, cu P.T. 190°C (cu descompunere).

Este puțin solubil în apă rece (1 : 10.000) și mai solubil la cald (1 : 400 la 100°C); puțin solubil în etanol (1 : 180); solubil în metanol (1 : 20), alcool izopropilic și propilenglicol și în soluții de hidroxizi alcalini și practic insolubil în cloroform și eter.

Este sensibil la lumină și *incompatibil* cu substanțele cu reacție acidă (hidroliză).

Soluțiile injectabile se pot prepara în apă în mediu slab alcalin, dar ele se colorează (nu pot fi păstrate) și de aceea se recomandă dizolvarea rutosidului în amestec de propilenglicol și apă cînd se obțin soluții mai stabile și cu un pH mai apropiat de neutralitate *(după F.R.IX și V. Stănescu, E. Savapol, 1981)*.

O proprietate importantă este capacitatea de a forma complecși stabili cu metalele grele, prin care se explică efectul lor inhibitor asupra unor sisteme enzimatice, cărora le sustrage metalul activator.

În *dozările chimice*, flavonele, flavonolii și heterozizii lor se reduc, în soluție alcoolică cu Mg/HCl conc. și se apreciază intensitatea culorii, care variază de la roz la roșu-aprins (sensibilitatea: 50 μg quercetol).

Existența unui număr foarte mare de flavonoide înrudite impune separarea lor prealabilă, de exemplu, prin tehnicile cromatografice, în diferite sisteme (apă: butanol; acizi organici; apă: metanol; amestecuri de hidrocarburi etc.) și aprecierea spoturilor în U.V. sau la lumină, de obicei după pulverizare cu săruri de Al, Fe, Pb, Th sau prin tratare cu vapori de amoniac (colorații diferite, după natura compușilor).

Testele biologice apreciază rezistența vasculară (capilară) la diferite specii (cobai, șobolan, șoarece etc.) prin metode variate. Astfel, de exemplu, pe pielea depilată de pe regiunea lombară se aplică o pîlnie atașată la un sistem de vid și se urmărește apariția peteșiilor, care, normal apar la o diferență de 10—15 mmHg; după gradul de carențare, peteșiile apar mai repede (sau la un vid mai redus) și se apreciază astfel cantitatea de substanță capabilă să „normalizeze" valorile; alte metode urmăresc unele modificări ale sîngelui venos după comprimarea vaselor, timpul de sîngerare, timpul de coagulare etc.

2.1.18.3. *METABOLISM. ROL BIOCHIMIC*

Biosinteza flavonelor are loc la plante, din unități de fenilpropan, respectiv de acid fenil-acetic, care intră în ciclul aromatic și în atomii $C_{2,3,4}$; restul atomilor de C provin, printr-o condensare „cap-la-coadă" din acetil-malonat *(H. D. Jakubke, H. Jesschkeit, 1976)*.

Vitamina P din alimente se absoarbe la nivelul intestinului, înregistrîndu-se un circuit entero-hepatic.

În ansamblu, se consideră că vitamina P este implicată în organismul uman și animal în procese de importanță fiziologică-biochimică ale pereților vasculari, cu creșterea rezistenței capilare, prin care controlează permeabilitatea capilară și presiunea sanguină; de exemplu, rutina, determină vasodilatație și crește, concomitent, contractibilitatea miocardului, mai ales în stările de oboseală.

Primele interpretări cu privire la mecanismele de acțiune ale vitaminei P asupra permeabilității capilare se refereau la efectul de creștere a intensității și duratei acțiunii adrenalinei pe mușchii izolați *(C. Lavallay, 1943; J. Neuman și colab., 1952)*. Teoriile mai noi susțin un efect vasoconstrictor direct (propriu) asupra musculaturii precapilare, probabil legat de fosforilarea ATP, și un efect indirect asupra rezistenței capilare, prin favorizarea acțiunii adrenalinei și a metaboliților săi de oxidare, în special adrenocromul, cunoscut pentru efectele

sale de creştere a rezistenţei capilare şi de reglare a capilarelor sanguine. În sprijinul acestei păreri vin observaţiile care relevă că la om şi diferite animale, rutozidul şi quercetolul, administraţi *per os*, se excretă prin urină sub forma unor metaboliţi, ca de exemplu, acizii 3,4-dihidroxi- şi m-hidroxi-fenilacetic, acidul homovanilinic *(De Eds şi colab., 1956)*, care apar şi ca produşi de metabolizare ai catecolaminelor: adrenalină şi noradrenalină. Această similitudine a metaboliţilor sugerează corelaţiile metabolice strînse cu hormonii medulosuprarenali (catecolamine) şi că flavonele (şi/sau metaboliţii lor) sînt substrate pentru enzimele de metabolizare (inactivare) ale catecolaminelor, ducînd astfel la un mecanism de competeţie între cele două categorii de compuşi pentru acelaşi sistem enzimatic, din care rezultă rolul vitaminei P „de protejare" şi deci de creştere a efectului catecolaminelor *(M. D. Armstrong, A. Mc. Millan, 1957; J. Lavallay, J. Neuman, 1962)*.

Pe de altă parte, vitamina P este un factor de „economisire" şi „protecţie" a vitaminei C, implicat în menţinerea sistemului: acid ascorbic/acid dehidroascorbic *(J. Parrat, J. M. Gazave, 1951, 1952)*. Această participare în sistemul oxido-reducător cuplat cu vitamina C este dovedită, cel puţin pentru plante, prin implicarea lor, alături de vitamina C, în reacţii de tipul:

a. ACID ASCORBIC $\xrightarrow{\text{ascorbicoxidază}}$ ACID DEHIDROASCORBIC + H_2O_2

b. FLAVONE REDUSE + H_2O_2 $\xrightarrow{\text{peroxidază}}$ FLAVONE OXIDATE + H_2O

c. FLAVONE OXIDATE + ACID ASCORBIC → FLAVONE REDUSE + ACID DEHIDROASCORBIC

Flavonele prezintă însă şi alte proprietăţi care pot explica efectul lor asupra permeabilităţii capilare, ca de exemplu acţiunea antihialuronidazică; antihistaminică (prin inhibarea decarboxilării histidinei la histamină); în asigurarea transferului de oxigen în capilare şi în acţiuni indirecte, prin intermediul tiroidei. La acestea se adaugă şi alte efecte metabolice ale vitaminei P: intervenţia în metabolismul apei şi electroliţilor (creşterea diurezei); în metabolismul glucidic (cu scăderea lactacidemiei); în metabolismul proteinelor (reechilibrarea raportului albumine/globuline, alterat în carenţă); inhibarea activităţii unor sisteme enzimatice, de exemplu, a tirozindecarboxilazei, xantinoxidazei, succinoxidazei, G-6-P-azei; la concentraţii ridicate manifestă acţiuni antibacteriene şi antivirale; unele izoflavone au efecte asupra suprarenalelor şi gonadelor (efecte estrogenice).

2.1.18.4. *AVITAMINOZA P*

Deşi nu se poate delimita cadrul unei avitaminoze P pure, totuşi, rolul său de „factor alimentar esenţial" (vitamină) se justifică prin corelaţia foarte strînsă cu vitamina C, cu stimularea creşterii rezervelor şi a activităţii vitaminei C şi sinergismul de acţiune în sistemele oxido-reducătoare (de unde denumirea de

Scanned with OKEN Scanner

vitamină C_2 sau „satelit" al vitaminei C), precum și prin unele simptome ce apar în carența sa, ca de exemplu: creșterea permeabilității capilare, cu apariția purpurelor hemoragice, a hemoragiilor retiniene, meningeale etc. Necesitățile se apreciază la aproximativ 200 mg/zi.

2.1.18.5. *FORME FARMACEUTICE. INDICAȚII*

Bioflavonoidele sînt indicate în stările patologice asociate cu creșterea permeabilității capilare și scăderea rezistenței capilarelor și respectiv în hemoragiile și fragilitatea capilară, ca de exemplu, în diabetul zaharat (însoțit de fragilitate vasculară); în hemoragiile de la nivelul diferitelor organe (plămîni, stomac, esofag, colite ulceroase); în diatezele hemoragice ale noului născut; în afecțiunile dermice: urticarii cronice, eritematoide, psoriasis; în prevenirea aterosclerozei.

Preparatele de *rutină* (rutozid) sub formă de comprimate (cu 20 mg) sau fiole (80 mg) se utilizează pentru efectele de vitamină P, de exemplu, scăderea permeabilității și fragilității vasculare în purpure (vasculare, boala Moller—Barlow) și în alte afecțiuni hemoragice: gastrointestinale (colite ulceroase), renale (nefrite), retiniene, postextracții dentare, în terapia cu anticoagulante, în pregătirea preoperatorie (împreună cu vitamina C și K), în diateze hemoragice; ictere hepatice; boli infecțioase acute asociate cu creșterea permeabilității capilare; în sarcină și alăptare și pentru efectele farmacologice în hipertensiunea arterială, ateroscleroză, artrite reumatice etc.

Preparatul *Tarosin* (500 mg acid ascorbic, 20 mg rutozid/comprimat) asigură menținerea tonicității și permeabilității vasculare normale, cu indicații în diatezele hemoragice, fragilitate capilară, hipertensiune arterială, ateroscleroză, glaucom, inflamații ale seroaselor (pulmonare, peritoneale, poliartrite), boli infecțioase acute, convalescențe, sarcină, alăptare.

2.1.19. VITAMINE MAI PUȚIN CUNOSCUTE SAU CONTESTATE

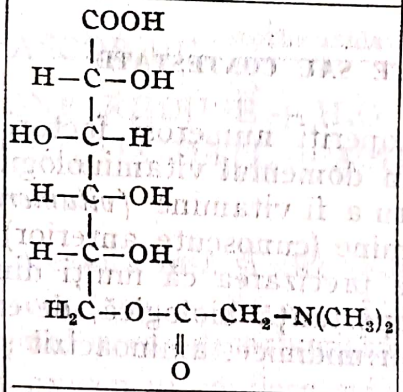
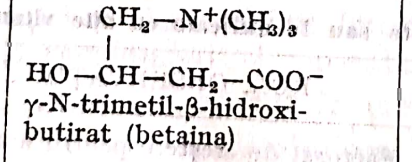
În decursul timpului au fost descoperiți numeroși factori considerați ca „vitamine". Cu progresul cunoștințelor în domeniul vitaminologiei s-a constatat că ei nu îndeplinesc toate condițiile pentru a fi vitamine *(vitameri, vitagene, cap. 2.1.1.6)* sau că sînt identici cu alte vitamine (cunoscute anterior). În *tabelul 2.9* se prezintă unii dintre acești factori, cu precizarea că mulți dintre ei, deși nu pot fi considerați vitamine manifestă importanță biologică, de exemplu, colina, AMP, acidul lipoic, bazele purinice și pirimidinice, aminoacizii și care sînt tratați în alte capitole.

TABELUL 2.9.

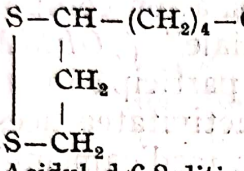
Vitamine puțin cunoscute, contestate sau identificate cu alte vitamine

DENUMIRE	STRUCTURA	ROL. OBSERVAȚII. CARENȚE.
VITAMINA B_3	Identică cu acidul pantotenic	Factorul de creștere pentru animale din drojdie
VITAMINA B_4	probabil identică cu COLINA, descrisă la cap. *Lipide*	Rol în metilări; necesară bacteriilor și animalelor, dar poate fi sintetizată. În lipsa ei se constată încetarea dezvoltării unor microorganisme; degenerescența grasă a ficatului la șobolan *(C. H. Best, M. E. Huntsman, 1932)*; ciroze, hemoragii renale și în globul ocular la șobolanul tînăr; perosis și alterarea tendoanelor la pui; degenerări și necroze renale. Participă, și la om, în metilări (efect lipotrop), în biosinteza acetilcolinei (neurotransmițător) și în alte numeroase procese metabolice *(a se vedea cap. „Metabolismul lipidelor" și „Metabolismul proteinelor", vol. II).*

TABELUL 2.9 *(continuare)*

DENUMIRE	STRUCTURA	ROL. OBSERVAȚII. CARENȚE
VITAMINA B_5	probabil un amestec de acid pantotenic, nicotinic, vit. B_6	
VITAMINA B_7	probabil identică cu biotina	Izolată din tărîțele de orez.
VITAMINA B_8	Identică cu acidul adenozin-monofosforic (CAMP, cAMP) *(cap. 1.3.6.3.)*	Compus nucleotidic foarte important, dar nu poate fi considerat ca o vitamină *(cap. „Metabolisme intermediare", „Mitocondrii", vol. II).*
VITAMINELE B_9, 10, 11	probabil identice cu acizii folici și vitamina B_{12}	Izolate din spanac, drojdie, ficat, cu efecte de creștere pe microorganisme și antianemice pe pui *(Briggs și colab., 1943) (cap. 2.1.15; 2.1.16).*
VITAMINA B_{13}	acidul orotic *(cap. 1.3.6.1.1.)*	Intermediar al biosintezei acizilor nucleici, cu rol de creștere și în metabolismul general *(cap. „Metabolismul acizilor nucleici", vol. II).*
VITAMINA B_{14} „factor din ser"	probabil derivă din xantopterină și ac. folici sub acțiunea enzimelor (lapte, ficat)	Izolată din urină (0,33 mg/litru de urină de om) cu rol în stimularea și proliferarea celulelor (inclusiv a reticulocitelor *in vitro*) și factor antianemic pentru șobolan
VITAMINA B_{15} Acid pangamic. Pangametina. Acid O—(N,N-dimetil-glicil)-6-D-gluconic; *„Bio-15"*		Acidul pangamic (izolat de *E. T. Krebs, și colab., 1951—1952)* participă, probabil, în sistemele oxido-reducătoare (coenzime a enzimelor respiratorii), cu efecte de ameliorare a anoxiei celulare, antiexudative, antihialuronidazică și de stimulare a sistemului hipofizo-suprarenal. Necesar: 2 mg/zi. Acidul pangamic și analogul său sintetic: glucono-di-(N-diizopropilamino)-acetat stimulează creatinogeneza și se recomandă în bolile cardiovasculare, reumatice și migrene; vasodilatator.
VITAMINA B_T. Vitamina T. Factor T-complex. Torultina. Termitina. Novaina. Factorul viermilor de făină.	pare identic cu *carnitina:*  γ-N-trimetil-β-hidroxi-butirat (betaina)	Factor de creștere pentru termite, alte insecte și pentru metamorfoza viermilor de făină, *Tenebrio molitor (W. Goetsch, 1947—1951):* izolat sub formă cristalizată din drojdie, mușchi etc. Mamiferele îl pot sintetiza și le servește în transportul grupărilor acil (acil-carnitina) prin membrana mitocondrială. Ar avea efecte de stimulare a dezvoltării copiilor imaturi.
Vitamina B_x	identică cu PAB sau cu acidul ascorbic	
VITAMINA G	riboflavina	
VITAMINA H_3	procaina	Principiul activ al Gerovitalului și Aslavitalului *(cap. 2.1.14)*
VITAMINA J	identică cu vit. C_2	
VITAMINELE L_1 și L_2	probabil identice cu unele vitamine din grupul B.	Factori de creștere a bacteriilor și de stimulare a lactației; primul din ficat, al doilea, din levuri.

TABELUL 2.9 *(continuare)*

DENUMIRE	STRUCTURA	ROL. OBSERVAȚII, CARENȚE
VITAMINA P_2		Derivați cu efecte similare vitaminei P
VITAMINA R	identică cu acizii folici	Izolată din ficat, levuri, cu efecte asupra pielii.
VITAMINA S	Idem	Idem
VITAMINA U Factor „antiulcus"	neidentificat	Ar avea efecte favorabile în ulcerul gastric uman și în ulcerul experimental produs prin histamină *(C. Cheney, 1942—1949)*. Se găsește în zeama de varză fermentată și în sucul de banane, utilizate în medicina populară pentru tratamentul ulcerului.
VITAMINA W	probabil identică cu acidul pantotenic	Factor necesar șobolanului
ACIDUL LIPOIC. Acid tioctic.	 Acidul d-6,8-ditiooctanic	Acidul lipoic a fost obținut cristalizat din extractele de ficat *(L. J. Reed, I. C. Gunsalus, 1953)* și s-a dovedit identic cu „protogenul". Este factor de creștere pentru *L. casei (Quirard, Snell, Williams, 1946)*, *Str. faecalis*, protozoarul *Tetrahymena geleii*. Constituie un factor necesar unor sisteme enzimatice cu vitamine B_1, B_2, P.P.
AMINOACIZI, BAZE PURINICE, PIRIMIDINICE		Unii aminoacizi sînt necesari microorganismelor, animalelor și omului; la fel, bazele azotate din structura acizilor nucleici, dar acești factori nu pot fi considerați ca vitamine

2.1.20. INTERRELAȚII VITAMINICE. PREPARATE POLIVITAMINICE

În descrierea vitaminelor s-au semnalat corelațiile complexe ce se stabilesc între ele: necesitatea unora pentru biosinteză (B_1, B_2, A pentru P.P.) sau structurarea (PAB în acizii folici) altora; posibilitatea înlocuirii reciproce (vit. C poate substitui alte vitamine). Asemenea interrelații se manifestă pregnant pe plan clinic și experimental: carența unei vitamine poate duce la afectarea altora, cu apariția frecventă a stărilor policarențiale. Aceste observații sînt valorificate în elaborarea unor preparate care conțin asocieri de vitamine, respectiv *preparate polivitaminice* care au, adesea, unele indicații comune: hipo- și avitaminoze policarențiale; tulburări de absorbție; astenie, anorexie, anemie, graviditate, lactație; la imaturi, sugari și copii, pentru stimularea creșterii și fortificare; în bolile infecțioase, convalescențe, intoxicații, în terapia cu diferite medicamente (de exemplu, antibiotice și sulfamide cu spectru larg) etc.

2.1.21. RECONSIDERAREA VITAMINELOR. IMPACTUL VITAMINELOR CU ORGANISMUL

În prezent, cînd atenția specialiștilor și a marelui public se focalizează asupra rolului alimentației în sanogenză și patogeneză, cînd practic se cunosc toate vitaminele, carențele și mijloacele de prevenire și vindecare, se impune o „reconsiderare" a vitaminelor în concepția *impactului* acestora cu organismul, care

relevă atît acțiunea vitaminelor, pînă la nivelul particulelor subcelulare și a proceselor biochimico-enzimatice, cît și, în special, „reacția" organismului prin activarea și/sau inactivarea vitaminelor.

Relația *„vitamine — organism"* comportă un ansamblu de procese de reciprocitate, concomitente, interconectate și nonseparabile, în cadrul unui *sistem* (cibernetic) cu un program de legături dinamice și versatile, care poartă amprenta ambelor entități: informația structurală a moleculei vitaminelor și metaboliților lor și modularea specifică a acesteia determinată de condițiile reale ale organismului.

În acest sens, trebuie accentuat faptul că majoritatea vitaminelor nu sînt active *per se* și își manifestă efectele numai după ce au suferit procesele de metabolizare care le schimbă informația moleculară (structura chimică), așa cum este în cazul vitaminelor B, care se integrează ca parte activă („coenzime") în numeroase sisteme enzimatice *(cap. 2.1.II.1)* sau al vitaminelor D *(cap. 2.1.3)* care necesită activări „secundare", similare hormonogenezei sterolilor, efectuate de către enzimele de metabolizare a medicamentelor și altor compuși străini („xenobiotici"), „oxidazele cu funcțiuni mixte microzomiale" *(„OFMM")*. Vitamina C *(cap. 2.1.17)* apare ca un „caz" aparte deoarece participă în structurarea sistemului *„OFMM"* (asigură aproximativ 30% din activitatea acestuia) care realizează reacțiile din prima fază de biotransformare a medicamentelor și compușilor străini și prezintă un „trunchi comun" de biosinteză cu a acidului glucuronic, agent major în procesele din faza a II-a, de „conjugare" (detoxefiere) a metaboliților endogeni și exogeni.

Această concepție a *„impactului"* dintre vitamine și organism permite *„reconsiderarea"* vitaminelor sub numeroase aspecte, dintre care menționăm: vitaminele aduse prin hrană sînt „principii alimentare", prelucrate de către enzimele *„biochimice"*; în cantități mari (terapeutice) ele se comportă ca substanțe străine și „forțează" căile de metabolizare efectuate de către enzimele *„xenobiotice"*, caracterizate prin procese de *inducție enzimatică*, de unde o serie de consecințe importante: apariția interacțiunilor intervitaminice, cu medicamentele, cu agenții poluanți, cancerigeni etc.; considerînd că moleculele vitaminelor trebuie să fie prelucrate de către enzimele „biochimice" și/sau „xenobiotice" se explică necesitățile diferite în vitamine în raport de *„individualitatea biochimică"* și respectiv de *„enzimoindividualitate"*, care ilustrează condițiile reale ale organismului. La baza acestor mari variații interindividuale stau o serie de factori care *condiționează* utilizarea și valorificarea vitaminelor: vîrsta, sexul, stările fiziologice speciale (graviditate, lactație, efort fizic), bioritmurile circadiene, circalunare și circaanuale, stările patologice, expunerea la agenții inductori ai *„OFMM"* (medicamente, agenți poluanți) etc., a căror cunoaștere complexă trebuie să fundamenteze *actul de decizie* în fixarea aportului optim de vitamine, pentru asigurarea sanogenezei și evitarea abuzului de vitamine *(D. Bedeleanu, M. Kory, 1976; D. Bedeleanu, 1976—1985)*.

BIBLIOTECA JUDEȚEANĂ „GH. ASACHI" IAȘI

Scanned with OKEN Scanner

BIBLIOGRAFIE SELECTIVĂ
(Cărți de referință, monografii, tratate, manuale)

ABABEI, L., TRANDAFIRESCU, M.: *Biochimie* (p. I). *Vitaminele hidrosolubile cu rol coenzimatic*, Lit. I.M.F. Iași, 626 (1974).

AEBI, H.: *Einführung in die praktische Biochemie*, Ed. S. Karger, Basel, München, Paris, London, New York, Sydney, 383 (1971)

* * * *Agenda medicală*, Ed. Med. București (1970—1985).

* * * *Annual Review of Biochemistry*, Ed. Annual Reviews Inc. Palo-Alto (1945—1981).

BACIU, I.: *Fiziologie*, Ed. Did. Ped., București, ed. II, 874 (1977).

BACIU, I.: *Hemostazia oxigenului*, Ed. Dacia Cluj-Napoca, 245 (1980).

BALȘ, M.: *Antibioticele*, Ed. Med., București, ed. II (1965).

BEDELEANU, D.: *Acizii nucleici — structură, fizico-chimie, biochimie*, în *Biologia moleculară și medicina modernă* (red. O. Fodor), Ed. Med., București, 57—75 (1969).

BEDELEANU, D.: *Scheme integrative de Biochimie farmaceutică* (curs), Lit. I.M.F. Cluj-Napoca, XI + 227 (1979).

BEDELEANU, D., KORY, M.: *Metabolismul medicamentelor*, „Biblioteca farmacistului", Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 246 (1976).

BENGA, GH.: *Biologia moleculară a membranelor cu aplicații medicale*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 299 (1979).

BERGMEYER, H. U. (red.): *Methods of Enzymatic Analysis*, Acad. Press, New York London (1965).

BERSIN, T.: *Biochemie der Vitamine*, Akad. Verlagsgesellschaft, Frankfurth am Main (1966)

BODEA, C. și colab.: *Tratat de biochimie vegetală*, Ed. Acad. R.S.R., I—V, București (1964—1984).

BRYSON, V., VOGEL, H. J. (red.): *Evolving Genes and Proteins*, Ed. Acad. Press, New York, London (1965).

BUDDECKE, E.: *Grundriss der Biochemie*, Ed. W de Gruyter, Berlin, New York, ed. IV. 516 (1974).

CAMPBELL, P. N., KILBY, B.A. (red.): *Basic Biochemistry for Medical students*, Acad. Press., London, New York, San Francisco (1978).

CANTAROW, A., SHEPARTZ, B.: *Biochemistry*, Ed. B. Saunders, Philadelphy, ed. IV, 898 (1967).

CÂRSTEANU, Mioara, VLĂDESCU, C.: *Colagenul — biochimie și fiziologie*, Ed. Acad. R.S.R., 149 (1982).

CHARGRAFF, E., DAVIDSON, J. N. (red.): *The Nucleic Acids*, Acad. Press., New York, London, 3 vol. (1955—1960).

CIONGA, E., AVRAM, L.: *Medicamente chimioterapice*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 782 (1978).

CONDACSE, A., RĂDULESCU, I. C., CAROLI. T.: *Porfirinele*, Ed. Med., București (1970).

COTRĂU, M.: *Toxicologie — principii generale*, Ed. Junimea, Iași, 228 (1978).

COULSTON, F., KORTE, F. (red.): *Environmental Quality and Safety*, Ed. G. Thieme, Stuttgart, Acad. Press, New York, London, vol. 3, 245 (1974).

COURTOIS, J. E., PERLES, L.: *Précis de Chimie biologique*, Ed. Masson & Cie, Paris, ed. II, vol. I., 459 (1964).

CUCUIANU, M.: *Biochimie clinică*, vol I., Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 302 (1977).

CUCUIANU, M., OLINIC, N., GOIA, A., FEKETE, T.: *Idem*, vol. II, 302 (1979).

CUPARENCU, B. (red.) și colab.: *Farmacologie pentru medici*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, vol. I, 366 (1976), vol. II., 279 (1978).

DICKSTEIN, S.: *Fundamentals of Cell Pharmacology*, Ed. C. Thomas, Springfield, Illinois, USA, 548 (1973).

Scanned with OKEN Scanner

DOBRESCU, D.: *Farmacoterapie*, Ed. Med. Bucureşti, 1053 (1981).

DUMITRU, I. F.: *Biochimie*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, 981 (1980).

DUMITRU, I. F.: *Nomenclatura Biochimiei*, Ed. Acad. R.S.R., Bucureşti, 295 (1984).

DUMITRU, I. F., MAGER, S., TURCU, A.: *Biochimie generală cu elemente de biochimie comparată*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, 536 (1973).

DUNCAN, G. G. (red.): *Bolile metabolismului*, Ed. Med., Bucureşti, vol. I, II, 1885 (1966).

DUŢU, ST., TEODORESCU EXARCU, I.: *Fiziologia şi fiziopatologia respiraţiei*, Ed. Med., Bucureşti, 422 (1979).

ENESCU, L.: *Biochimie. Vitaminele liposolubile*, Lit. I.M.F. Iaşi, 379 (1975).

* * * FARMACOPEEA ROMÂNĂ, Ed. Med., Bucureşti: ed. VIII (F.R. VIII), 946 p. (1965); *ed. IX (F.R. IX)*, 1005 (1976).

FELSZEGHY, E., ABRAHAM, E.: *Biochimie*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, 438 (1972).

FRAGNER, J. şi colab.: *Vitamine: Chemie und Biochemie*, VEB G. Fischer, Jena, I—II, (1964, 1965).

FREESE, E.: *Molecular Genetics*, Ed. Acad. Press, New York, London (1963).

GEISSLER, E.: *Molecularbiologie*, VEB Bibliographisches Institut, Leipzig, 356 (1972).

GONŢEA, I.: *Alimentaţia raţională a omului*, Ed. Did. Ped., Buc., 560 (1971).

GOUNELLE, H., MARNAY, C.: *Cum interpretăm semnele şi carenţele vitaminice?*, Ed. Med., Bucureşti, 121 (1965).

GRECU, I., CUREA, E.: *Interacţiuni între substanţele macromoleculare şi medicamentoase*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 179 (1976).

HARPER, H. A., RODWELL, V. W. MAYES, P.A.: *Review of Physiological Chemistry*, Ed. Lange Med. Publ., Drawer L., Los Altos, California, USA (1979).

HOFMANN, E.: *Eiweisse und Nucleinsäures als biologische Makromolekule, Dynamische Biochemie* (p.I), Ed. Akademie, Berlin, 157 (1957).

IONESCU, C.: *Chimie fizică*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, 322 (1982).

IONESCU ŞTOIAN, P., CIOCĂNELEA, V., ADAM, K., BAN, I., RUB-SAIDAC, Aurelia, GEORGESCU, Liana, SAVOPOL, E.: *Tehnică farmaceutică*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, ed. II, 743 (1974).

JAKUBKE, H. D., JESSCHKEIT, H.: *Brockhaus ABC Biochemie*, VEB F.A. Brockhaus, Leipzig, 605 (1976).

KETZ, H.A.: *Vitamine*, Ed. Urania, Leipzig, Jena, Berlin, 131 (1976).

KORTE, F., GOTO, M.: *Natural Compounds (p. 2): Antibiotics, Vitamins and Hormones*, Ed. G. Thieme, Stuttgart, Acad. Press, San Francisco, London, Maruzen Co., Tokyo, 304 (1977).

LEHNINGER, A. L.: *Biochemistry. The molecular basis of cell structure and function*. Ed. Worth Publ. Inc., New York (1978).

MACOVSCHI, E.: *Biostructura*, Ed. Acad. R.S.R. Bucureşti, 258 (1969); *Natura şi structura materiei vii*, idem, 183 (1972).

MAHLER, H. R., CORDES, E.H.: *Biological Chemistry*, Ed. Harper & Row, New York, London [1975).

MANTA, I.: *Manual de Biochimie medicală*, Tip. „Cartea Românească din Cluj", Sibiu, 428 (1945).

MANTA, I., BEDELEANU, D., BACLEŞEANU, Cornelia, BÂRZU, O., JEBELEANU, GH.: *Biochimie medicală*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, 754 (1968).

MANTA, I., CIPLEA, AL. *Metodele laboratorului clinic*, ed. I. Tip. „Cartea Românească din Cluj", Sibiu (1944), ed. II, Idem., Cluj (1947).

MANTA, I., CUCUIANU, M., BENGA, GH., HODÂRNĂU, Adriana, *Metode biochimice în laboratorul clinic*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca 513 (1976).

MANTA, I., JEBELEANU, GH.: în *Biologia moleculară şi medicina modernă* (red. O. Fodor), Ed. Med., Bucureşti, vol. I. 76—97 (1969), vol. II 30—52 (1971).

MANTA, I. (red.), VANGHELOVICI, M., SIBI, M., OERIU, S., SORU, E., MAFTEI, E., KISS-EPERESSY, A., KOVACS, A., BATCU, A., BEDELEANU, D.: *Biochimie medicală*, Ed. Did. Ped., Bucureşti, 767 (1965).

MARTIN, D. W. Jr., MAYES, P. A., RODWELL, V. W.: *Harper's Review of Biochemistry*, ed. 19, Lange Medical Publications, Marusen, Asia, 638 (1983); idem, ed. 20, Los Alto, California, 718 (1985).

Scanned with OKEN Scanner

MAZUR, A., HAROW, B.: *Textbook of Biochemistry*, Ed. W. B. Saunders (1971).

MOGOȘ, GH.: *Proteinele — fiziologie, fiziopatologie, chimie*, Ed. Med., București, ed. II (1966).

MORARU, I., ANTOHI, ST.: *Introducere în genetica moleculară*, Ed. Med., București, ed. II. (1966).

MUNGIU, O. C.: *Farmacologie biochimică*, Lit. I.M.F. Iași, 140 (1965).

NEAMȚU, G.: *Biochimie vegetală*, Ed. Ceres, București, 432 p (1981).

NEAMȚU, G.: *Biochimie ecologică*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 251 p. (1983).

NEAMȚU, G., POPESCU, Ionela, St. LAZAR, I. BURNEA, I. BRAD, Gh. CÎMPEANU, T. GALBEN: *Chimie și biochimie vegetală*, Ed. Did. Ped., București, 482 (1983).

NENIȚESCU, C. D.: *Chimie organică*, Ed. Did. Ped., ed. VIII, vol. I., 932, vol. II, 1051 (1980).

PERUTZ, M. F.: *Proteins and Nucleic Acids*, Ed. Elsevier, Amsterdam (1962).

POPESCU, Aurora, CRISTEA, Elena, ZAMFIRESCU-GHEORGHIU, Marcela: *Biochimie medicală*, Ed. Med., București, 773 (1980).

PORA, E. (red.): *Homeostazia*, Ed. St. Enciclop., Buc., 297 (1981).

RAICU, P.: *Genetica*, Ed. Did. Ped., București, 634 (1980).

RAPOPORT, S. M.: *Medizinische Biochemie*, VEB Volk, u. Gesundheit, Berlin, (1975).

RAUEN, H. M.: *Biochemische Taschenbuch*, Ed. Springer, Berlin, Göttingen, Heidelberg, 1332 (1956).

RAWN, J. D.: *Biochemistry*, Harper & Row Publischers, New York, Cambridge, Philadelphia, San Francisco, London, Mexico City, Sao Paulo, Sydney, 1139 (1983).

REINBOTHE, H.: *Einführung in die Biochemie*, Ed., G. Fischer, Jena, 544 (1975).

REINBOTHE, H., SCHLEE, D.: *Moleküle der Natur*, Ed. Urania, Leipzig, Jena, Berlin, ed. II, 128 (1978).

ROSETTI-COLȚOIU, Matilda, OTELEANU, D.: *Biocatalizatorii în practica medicală și farmaceutică*, Ed. Med., București, 323 (1980).

SĂLĂGEAN, N.: *Fotosinteza*, Ed. Acad. R.S.R., București, 241 (1972).

SHAPIRA, G., DREYFUS, J. C.: *Pathologie Moléculaire*, Ed. Masson, Paris (1975).

SIMIONESCU C., GORDUZA, Valeria: *Polimeri biocompatibili și biologic activi*, Ed. Acad. R.S.R., 479 (1980).

SIMIONOVICI, M., CÂRSTEA, AL., VLĂDESCU, C.: *Cercetarea farmacologică în prospectarea medicamentelor*, Ed. Med., București, 473 (1983).

SORU, Eugenia: *Biochimie medicală*, Ed. Med., București, I—II, 1651 (1959, 1963).

* * * *Specifications and Criteria for biochemical Compounds*, Ed. Natl. Acad. Sci., Washington (1972).

STANBURY, J. B., WYNGAARDEN, J. B., FREDRICKSON, D. S (red.): *The Metabolic basis of inherited diseases*, Ed. Mc. Graw-Hill, New York, ed. IV (1978).

STĂNESCU, V., SAVOPOL, E.: *Incompatibilități medicamentoase*, Ed. Med., București, 606 (1981).

STRĂJESCU, M., TEODOR, Felicia: *Elemente de chimie bioanorganică*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 437 (1979).

STROESCU, V.: *Bazele farmacologice ale practicii medicale*, vol. I, Ed. Med., București, 486 (1984).

STRYER, L.: *Biochemistry*, Ed. W. H. Freeman & Comp., San Francisco, 877 (1975).

ȘTIRBAN, M.: *Procese primare în fotosinteză*, Ed. Dacia, Cluj-Napoca, 230 (1981)

TĂMAȘ, V., ȘERBAN, M., Maria COTRUȚ: *Biochimie medicală veterinară*, Ed. Did. Ped., București, 597 (1981).

TĂNĂSESCU, GH., POPA, M. V., VARALEANU Alexandrina: *Glucidele*, Ed., Med., București, 299 (1973).

TEODORESCU EXARCU, I. (red.): *Patologie biochimică*, Ed. Med., București, 1437 (1974).

TEODORESCU EXARCU, I. (red): *Fiziologia și fiziopatologia hemodinamicii*, Ed. Med., București, 799 (1984).

TERROINE, TH.: *Les interrelations vitaminiques*, Ed. CNRS, Paris (1966).

TRAVERS, A.: *Biochemistry of Nucleic Acids* (red. K. BURTON), Ed. Butterworths, London, Baltimore (1974).

VÎLCU, AL.: *Eritrocitul*, Ed. Med., București (1977).

Scanned with OKEN Scanner

WALTHER, H.: *Klinische Pharmakologie*, Ed. Volk u. Gesundheit, Berlin, 659 (1974).
WATSON, J. D.: *Biologia moleculară a genei*, Ed. Ştiinţifică, Bucureşti, 551 (1974).
WEIL, J. N.: *Biochimie generale*, Ed. Masson, Paris (1975).
WHITE, A. P., HANDLER, E., SMITH, L.: *Principles of Biochemistry*, Ed. Mc. Graw-Hill, New York (1968).
WINKLER, L.: *Klinische Biochemie*, VEB Verlag Volk u. Gesundheit, Berlin, 352 (1982).
ZAMFIRESCU GHEORGHIU, Marcela: *Tendinţe şi direcţii de dezvoltare în biochimia medicală*, Ed. Acad. R.S.R., 176 (1983).
ZINCA, S.: *Biochimie animală*, Ed. Did. Ped. Bucureşti, 581 (1971).

Redactor: FELICIA TEODOR
Tehnoredactor: CONSTANTIN RUSU

Apărut: 1985. Bun de tipar: 09.12.1985. Comanda nr. 1857.
Coli de tipar: 31. Hîrtie: velină 70 g/mp. Format: 70×100/16.

Tiparul executat sub comanda nr. 200
la INTREPRINDEREA POLIGRAFICĂ CLUJ
Municipiul Cluj-Napoca
B-dul Lenin nr. 146
Republica Socialistă România

Scanned with OKEN Scanner